

Die Polyketidsynthase ALB1 und
die mitogen-aktivierte Proteinkinase MAKB:
Einflussfaktoren der
Morphogenese und Differenzierung
in *Aspergillus niger*

VON DER FAKULTÄT FÜR LEBENSWISSENSCHAFTEN
DER TECHNISCHEN UNIVERSITÄT CAROLO-WILHELMINA
ZU BRAUNSCHWEIG
ZUR ERLANGUNG DES GRADES
EINES DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr.rer.nat)
GENEHMIGTE
DISSERTATION

von: Bert-Ewald PRIEGNITZ

aus: LÜBZ

1. Referent: Professor Dr. André FLEISSNER

2. Referent: Professor Dr. Norbert F. KÄUFER

eingereicht am: 30.10.2013

mündliche Prüfung (Disputation) am: 13.12.2013

Druckjahr 2014

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Priegnitz B-E, Wargenau A, Brandt U, Rohde M, Dietrich S, Kwade A, Krull R, and Fleissner A, 2012, The role of initial spore adhesion in pellet and biofilm formation in *Aspergillus niger*. FG&B 49.1, S.30-38

Tagungsbeiträge

Priegnitz B-E, Wargenau A, Brandt U, Rohde M, Dietrich S, Krull R and Fleißner A, Vortrag: The Contribution of Melanin to Spore Surface Characteristics in *Aspergillus niger*, 10th VAAM-Symposium, Marburg, 2011

Priegnitz B-E, Wargenau A, Brandt U, Rohde M, Dietrich S, Krull R and Fleißner A, Poster: The Contribution of Melanin to Spore Surface Characteristics in *Aspergillus niger*, 11th European Conference on Fungal Genetics, Marburg, 2012

Priegnitz B-E, Brandt U and Fleißner A, Poster: The *Saccharomyces cerevisiae* FUS3 homologue MAKB in *Aspergillus niger* is a central regulator connecting differentiation and secondary metabolite production with nutrient availability and light, 27th Fungal Genetics Conference, Asilomar, 2013

Inhaltsverzeichnis

Vorveröffentlichungen

Zusammenfassung	1
Summary	3
1 Einleitung	5
1.1 Pilze und ihre Bedeutung für den Menschen	5
1.2 Der filamentöse Schimmelpilz <i>Aspergillus niger</i>	9
1.2.1 Die Konidienbildung in Aspergillen	11
1.3 Industrielle Bedeutung von <i>Aspergillus niger</i>	14
1.3.1 Einsatzbereiche und biotechnologische Anwendungen	14
1.3.2 Produktivität - Einflüsse und Abhängigkeiten	15
1.3.3 Biofilm - Eine alternative submerse Kultivierungsform	17
1.3.4 Modell der Pelletbildung	18
1.3.5 Die primäre Sporenaggreagation	19
1.4 Melanin	21
1.4.1 Bedeutung und Synthese von Melanin in <i>Aspergillus niger</i>	21
1.5 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen	23
1.5.1 Aufbau von mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kaskaden	23
1.5.2 Aufgaben von mitogen-aktivierten Proteinkinasen in der Bäckerhefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
1.5.3 Aufgaben und Funktionen von MAKB-orthologen MAP-Kinasen in Pilzen	26
1.5.4 Lokalisierung von mitogen-aktivierten Proteinkinasen in filamentösen Pilzen	28
1.6 Ziel der Arbeit	30

2	Materialien und Methoden	33
2.1	Stämme und Plasmide	33
2.1.1	<i>Aspergillus niger</i> : Stämme - Plasmide - Wachstum	33
2.1.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> : Stämme - Plasmide - Wachstum	36
2.1.3	<i>Escherichia coli</i> : Stämme - Wachstum	38
2.2	Material	39
2.2.1	Chemikalien	39
2.2.2	Puffer und Lösungen	40
2.2.3	Primer	42
2.3	Quantifizierungsmethoden	44
2.3.1	Quantifizierung der Sporulationsrate	44
2.3.2	Quantifizierung der Keimungsrate	45
2.3.3	Quantifizierung der Hyphenwachstumsgeschwindigkeit	45
2.3.4	Der Sporenaggregations-Assay	46
2.3.5	Quantifizierung der Sporenaggregation mit einer Partikelmesssonde	47
2.3.6	Benässbarkeits- und Hydrophobizitäts-Assay	47
2.4	Beeinflussung der Morphologie	48
2.4.1	Synchronisation der Pilzmyzel Entwicklung	48
2.4.2	Biofilmbildung	50
2.5	Analyse der Morphologie und Fluoreszenz-mikroskopie	50
2.5.1	Mikroskopie	50
2.5.2	Rasterelektronenmikroskopie	51
2.5.3	Herstellung von Pellet- und Biofilmschnitten	51
2.6	DNA-Isolierung	52
2.6.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	52
2.6.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	52
2.6.3	Isolierung von genomischer DNA aus <i>Aspergillus niger</i>	53
2.7	DNA-Transformation	54
2.7.1	DNA-Transformation in <i>Escherichia coli</i>	54
2.7.2	DNA-Transformation in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
2.7.3	DNA-Transformation in <i>Aspergillus niger</i>	55

2.8	DNA-Modifizierung	56
2.8.1	DNA-Amplifizierung durch PCR	56
2.8.2	Agarosegelelektrophorese	56
2.8.3	Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	57
2.8.4	RT-PCR	57
2.8.5	Restriktionsverdau	57
2.8.6	Ligation	58
2.8.7	Rekombinante Hefeklonierung und „Gene Replacement“ durch homologe Rekombination	58
2.9	Biochemische Analysen	60
2.9.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot	60
2.9.2	Southern Blot	64
2.9.3	Analyse der Sukraseaktivität	65
2.9.4	Analyse der Glucoamylaseaktivität	66
2.9.5	Eichgerade zur Umrechnung der Glucoamylaseaktivität	67
2.9.6	Bestimmung der Glukosekonzentration im Medium	67
3	Ergebnisse	69
3.1	Die primäre Sporenagglomeration und ihr Beitrag zur Pelletbildung . .	69
3.1.1	Charakterisierung des <i>alb1</i> -Gens und Vergleich mit orthologen Genen	69
3.1.2	<i>Alb1</i> wird in sporulierenden Kulturen, nicht aber in ruhenden Sporen oder jungen Keimlingen exprimiert	70
3.1.3	Ausschaltung von <i>alb1</i> durch Gene-Replacement	72
3.1.4	Charakterisierung der $\Delta alb1$ -Mutanten	73
3.1.5	$\Delta alb1$ -Konidien weisen eine veränderte Oberflächenstruktur auf	74
3.1.6	Die Hydrophobizität der $\Delta alb1$ - und Wildtyp-Sporen ist identisch	75
3.1.7	Das Zeta-Potential von Albino-und Wildtyp-Sporen unterschei- det sich	77
3.1.8	$\Delta alb1$ -Konidien zeigen ein verändertes Sporenagglomerations- verhalten	79
3.1.9	Zeitliche Analyse der Sporenagglomeration	80

3.1.10	Eine veränderte Sporenaggregation hat keinen Einfluss auf die abschließende Pelletgröße und -struktur	83
3.1.11	Die Sukrase- und Glucoamylaseproduktivität von $\Delta alb1$ - und Wildtyp-Stämmen in Flüssigmedium unterscheiden sich nicht. .	84
3.1.12	Sporen ohne Melanin zeigen eine verbesserte Oberflächenanhaftung	85
3.1.13	Biofilme produzieren im Vergleich zu Pelletkulturen mehr Glucoamylase	88
3.1.14	Stoffwechselaktive Bereiche in Biofilmen	89
3.1.15	<i>fwn</i> , die klassische $\Delta alb1$ -Mutante	90
3.2	Die MAP-Kinase MAKB, ein Regulator der Sporenbildung in <i>Aspergillus niger</i>	92
3.2.1	Charakterisierung von <i>makb</i> und <i>ste7</i>	92
3.2.2	Herstellung der <i>makb</i> - und <i>ste7</i> -Mutanten	93
3.2.3	Die $\Delta makb$ - und $\Delta ste7$ -Mutanten zeigen pleiotrope Veränderungen gegenüber dem Wildtyp	97
3.2.4	Nährstoff- und Zelldichte-abhängige Induktion der Sporenbildung	109
3.2.5	Die Bildung von Konidien wird in Flüssigkultur durch Hungerstress induziert	117
3.2.6	Bestimmung der minimalen Glukose-Konzentration für die MAKB induzierte Konidienbildung	119
3.2.7	Herstellung von <i>makb-gfp</i> -Stämmen	121
3.2.8	MAKB wird in Konidiophoren exprimiert.	123
3.2.9	Nährstoffabhängige Detektion von MAKB-GFP in Konidiophoren.	126
3.2.10	MAKB-GFP ist in Flüssigkultur nicht detektierbar.	127
3.2.11	Herstellung der <i>ste7daAB</i> -Mutante	128
3.2.12	Die dauerhafte Aktivierung von MAKB beeinflusst die morphologische Entwicklung von <i>Aspergillus niger</i>	131
3.2.13	Die Konidiophorentwicklung erfolgt in <i>ste7daAB</i> früher als in AB1.13	134
3.2.14	Aktivierungsnachweis der Kinase MAKB.	135
3.2.15	MAKB ist an der Regulierung der Sekretion von Sekundärmetaboliten beteiligt	137

4 Diskussion	139
4.1 Beitrag der Oberfläche von <i>Aspergillus niger</i> Konidien zur Pelletmorphologie in Flüssigkultur	139
4.2 Aufgaben der mitogen-aktivierten Proteinkinase MAKB in <i>Aspergillus niger</i>	147
Literatur	159
5 Anhang	177
5.1 Messwerte	177
5.2 Plasmidkarten	183
Abkürzungen	187
Danksagung	188

Zusammenfassung

Der filamentöse Pilz *Aspergillus niger* ist ein wichtiger Produktionsorganismus für die Herstellung einer Vielzahl von Grundstoffen für die Lebensmittel- sowie chemische Industrie. Die Ausbeute dieser Prozesse hängt dabei stark von der Morphologie ab, die der Pilz während der Kultivierung einnimmt, wobei bei diesen Prozessen bevorzugt Pellets, einige Millimeter große, runde Myzelaggregate, Anwendung finden.

Ein anerkanntes Modell beschreibt die morphologische Entwicklung von der Spore bis zum endgültigen Pellet und postuliert, dass bereits die ersten Interaktionen der ruhenden Sporen die abschließende Pelletstruktur beeinflussen können.

Diese Hypothese konnte im Verlauf dieser Arbeit durch Interaktionsexperimente mit Sporen, die unterschiedliche Oberflächeneigenschaften aufweisen, widerlegt werden. Die Veränderung der Sporenoberfläche erfolgte durch Inaktivierung der Melanin-Biosynthese, wobei Melanin in *A. niger* ausschließlich in Konidien vorkommt. Die Biosynthese wurde durch die Deletion des Gens *alb1* unterbrochen. Im Wildtyp katalysiert die Polyketidsynthase ALB1 den ersten Schritt der Melaninproduktion. Konidien der entsprechenden Mutante sind deutlich heller, zeigen eine veränderte Oberflächenstruktur und ihre Oberfläche ist, pH-Wert-abhängig, positiver geladen. Abgesehen von diesen Veränderungen weist die Albino-Mutante keinerlei Beeinträchtigungen gegenüber dem Wildtyp auf.

Die Sporeninteraktionen wurden in Medium bei zwei unterschiedlichen pH-Werten untersucht, welche deutliche Unterschiede in der Oberflächenladung und somit den Abstößungskräften der Wildtyp- und Albino-Konidien verursachten. Obwohl wir eindeutige Veränderungen bei der primären Sporenagglomeration der ruhenden Sporen beobachteten, konnten wir keine Unterschiede nach dem Einsetzen der sekundären Sporen-Hyphen-Aggregation erkennen. Auch die abschließende Pelletstruktur sowie die Produktivität beider Stämme waren identisch. Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die Sporen-Hyphen- sowie Hyphen-Hyphen-Interaktionen einen größeren Einfluss auf die Pelletbildung haben, als die primäre Sporeninteraktion.

Für die Biofilmbildung scheint die primäre Sporenanheftung an eine Oberfläche essentiell zu sein. Biofilme stellen gegenwärtig keine relevante Produktionsmorphologie dar, es

gibt aber unterschiedliche Ansätze diese zu etablieren. Vergleichende Untersuchungen mit Albino- und Wildtyp-Sporen zeigten, dass die Albino-Mutante eine leicht verbesserte Fähigkeit besitzt, einen Biofilm auf polymeren Oberflächen zu bilden. Dies führt zu der Vermutung, dass, im Gegensatz zur Pelletbildung, die primäre Sporeninteraktion mit der Trägeroberfläche essentiell für die Biofilmbildung ist und dass diese Interaktionen von der Oberflächenladung beeinflusst werden können. Aktivitätsanalysen zeigten eine neunmal höhere Glucoamylaseaktivität von Biofilmüberständen verglichen mit Pelletüberständen.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschreibt den Beitrag der MAP-Kinase MAKB zur Morphogenese und Differenzierung von *A. niger*. Ausgangspunkt für die Versuche war die Beschreibung eines depolarisierten Spitzenwachstums von $\Delta makb$ -Hyphen in Flüssigkultur. Da die Hyphenspitzen in filamentösen Pilzen die sekretionsstärksten Bereiche darstellen, könnte solch ein Phänotyp Ansatzmöglichkeiten für die Steigerung der Sekretion von Produkten darstellen.

Unsere Untersuchungen der MAP-Kinase MAKB konnten ein depolarisiertes Wachstum der Hyphenspitzen in *A. niger* nicht bestätigen.

Nichtsdestoweniger konnten wir zeigen, dass die MAP-Kinase MAKB ein pleiotropes Aufgabenspektrum in *A. niger* besitzt. So ist in *makb*-Deletionsmutanten die Sporenkeimung beeinträchtigt, sie zeigen eine reduzierte Wachstumsgeschwindigkeit der Hyphen und unter bestimmten Bedingungen bleibt die Myzeldichte-abhängige Induktion der Konidienbildung vollständig aus.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein zweiter, bisher unbekannter Signalweg die Sporenbildung in *A. niger* induzieren kann. Die Induktion der Sporenbildung durch den unbekannten Signalweg hängt von der zur Verfügung stehenden Nährstoffmenge ab und ist, im Gegensatz zur MAKB-abhängigen Induktion, unabhängig von äußeren Umwelteinflüssen wie dem Zugang zu Luft. Die Ergebnisse führen zu der Vermutung, dass der Signalweg das Überleben und die Verbreitung des Pilzes unter ungünstigen Umweltbedingungen sicherstellt, wohingegen die MAKB-abhängige Sporeninduktion die Sporenbildung unter günstigeren Bedingungen garantiert.

Summary

The filamentous fungus *Aspergillus niger* is an important production-organism for various substances applied in the food and chemical industry. The yield of these production processes highly depends on the morphology the fungus adapts during the cultivation. Pellets, mycelia spheres of some millimeter in diameter, present the most common production unit.

An established model describing the morphological development from spores to mature pellets hypothesizes that the initial interaction of dormant spores influences the final pellet structure.

In the course of this thesis, this hypothesis was proven wrong by interaction experiments with spores exhibiting altered surface properties. The alteration was based on the inactivation of the melanin biosynthesis pathway. In *A. niger*, melanin is exclusively present in spores. The synthesis was disrupted by the deletion of the polyketide synthase gene *alb1*. ALB1 catalyzes the first step of melanin production. Spores of the resulting mutant are of clearly brighter color, show an altered surface structure and a pH-dependent, more positive surface charge. Beside this, the albino mutant has no further impairments compared to the wild type.

Spore-interactions were tested in media with two different pH-values, causing clear differences in surface charge and therefore rejection forces between wild-type and mutant conidia. Although we observed clear differences in the primary agglomeration behavior of the dormant spores, no differences were found between the two strains after onset of the secondary spore/hyphae aggregation. Moreover, the final pellet structure and the productivity of both strains were identical. These observations suggest that the interaction of spores and hyphae and between hyphae contribute more to the pellet formation than the primary spore interaction.

For biofilm formation, the primary spore attachment to a support layer, appears to be essential. Biofilms are no common production morphologies in industrial application, although first attempts to establish them are made. Comparisons of the albino and wild-type strains showed a slightly better ability of the albino spores to form a biofilm on polymeric surfaces. This suggests that, in contrast to pellet formation, the primary

spore interaction with the support layer is indeed essential for biofilm formation and that this interaction is influenced by surface charge. Activity assays revealed a nine-fold higher glucoamylase activity in the biofilm supernatant compared to the pellet supernatant.

The second part of this thesis describes the contribution of the MAP kinase MAKB to the morphogenesis and differentiation of *A. niger*. These investigations were prompted by the description of depolarized hyphal growth of $\Delta makb$ mutants in liquid medium. As filamentous fungi secrete mostly at hyphal tips, this phenotype could present an approach to improve product secretion.

Our analysis of the MAP kinase MAKB in *A. niger* did not confirm the depolarized growth of hyphal tips.

Nevertheless, we found that the MAP kinase MAKB possesses a pleiotropic range of tasks. The *makb* deletion mutant is affected in spore germination, showed a reduced hyphal growth rate and, under certain conditions, the complete absence of the mycelia-density dependent induction of spore formation. Furthermore, we could show that spore formation is induced by a second, so far unknown, pathway in *A. niger*. The induction of spore formation by this unknown pathway depends on the amount of available nutrients and is, in contrast to the MAKB-dependent induction, independent of environmental influences such as the accessibility to ambient air. These data suggest that this pathway ensures the survival and the distribution of the fungus under unfavorable conditions, while MAKB dependent spore induction guarantees the spore formation and reproduction under favorable conditions.

1 Einleitung

Die biologische Herstellung von Enzymen, Antikörpern, Grundstoffen für Medikamente sowie die alternative Erzeugung von Ausgangsstoffen für die chemische Industrie mit Hilfe von Mikroorganismen gewinnt in der heutigen Zeit immer mehr an Bedeutung. In dieser Entwicklung nehmen Pilze eine wichtige Rolle ein. Sie sind in der Lage für den Menschen relevante Substanzen wie Zitronen- oder Gluconsäure zu erzeugen, sind gentechnisch manipulierbar und besitzen, da sie ihre Nahrung außerhalb des Myzels verdauen, diverse Mechanismen zur Ausschleusung von Enzymen und chemischen Verbindungen. Trotz all dieser Vorteile gibt es auch Probleme bei der Verwendung von Pilzen als Produktionsorganismen. So sind regelmäßig erhebliche Schwankungen bei der Ausbeute aus biotechnologischen Produktionsprozessen zu beobachten. Auch der Gesamtertrag, vor allem heterolog exprimierter Proteine, ist in vielen Bereichen unbefriedigend. Es gibt daher stetige Bemühungen die Produktionsverfahren zu verbessern, wobei sich eine Vielzahl von Lösungsansätzen ergeben haben; angefangen bei der Optimierung der Kultivierungsbedingungen über die ektopische Überexpression der am Produkt beteiligten Enzyme, bis hin zum Anpassen der Produkte an die jeweiligen Sekretionswege.

1.1 Pilze und ihre Bedeutung für den Menschen

Pilze begleiten den Menschen seit Anbeginn der Zeitrechnung. Dabei wurde ihr Beitrag für das Leben der Menschen oftmals weder erkannt noch entsprechend gewürdigt. Die Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) ist wahrscheinlich der erste Ascomyzet, der regelmäßig zur Lebensmittelherstellung verwendet wurde. Die ältesten Dokumentationen, die auf seine Verwendung schließen lassen, stammen aus Mesopotamien und beschreiben Gärprozesse bei der Brot-, Bier- und Weinherstellung, die auf pilzliche Anheftungen an den verwendeten Getreide bzw. Früchten zurückgeführt werden können. Dieses Unwissen über den Beitrag der Hefen spiegelt sich auch im deutschen Reinheitsgebot von 1516 wieder: "...zu keinem Bier mehr Stücke als allein Gersten, Hopfen und Wasser verwendet ..." (Wilhelm IV von Bayern, 1516), in welchem die Hefe mit keinem Wort

erwähnt wird. Erst Louis Pasteur beschrieb die Hefen und erkannte ihren essentiellen Beitrag zu Fermentationsprozessen. Darüber hinaus wies er nach, dass Verunreinigungen des Gärgutes mit anderen Hefen oder Bakterien die Ursache für ungenießbare Biere und Weine sind (Pasteur 1876).

Ein positives Beispiel für die Nutzung von Pilzen ist die Verwendung des Koji-Pilzes (deutsch: Blüte des Schimmels) bei der Herstellung von Amasake (Süßungsmittel), Miso (Sojabohnen-Paste) und anderen asiatischen Lebensmitteln. Die Fermentationstechniken lassen sich rund 2000 Jahre zurückverfolgen und hatten wahrscheinlich in China ihren Ursprung, von wo aus sie den gesamten asiatischen Raum eroberten. Beindruckend an dieser Entwicklung ist die Komplexität der aufeinander aufbauenden Abläufe, die ohne chemisches oder mikrobiologisches Wissen soweit optimiert wurden, dass sie bis heute in der Lebensmittelproduktion Anwendung finden. Ein Beispiel dieser hervorragenden Leistung stellt die Sake-Produktion dar. Dabei handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess, an dessen Anfang die Aufspaltung von Polysacchariden zu Monosacchariden wie Glukose steht. Die Reaktion wird durch α -Amylasen katalysiert, Enzyme die von allen Stärke abbauenden Pilzen, insbesondere aber vom Koji-Pilz (*Aspergillus flavus* var. *oryzae*) sekretiert werden. Nach Abschluss der Inkubation des Substrats mit dem Koji-Pilz wird dieser durch Erhitzen abgetötet und zum verbleibenden Substrat, im Fall von Sake ist dies Reis, eine kleinen Menge einer zweiten, unabhängig von der ersten inkubierten Kultur, die *S. cerevisiae* enthält, gegeben. Die Hefe nutzt die nun verfügbare Glukose als Energiequelle und leitet unter Sauerstoffabschluss die alkoholische Gärung ein (Reddy *et al.* 1983).

Die Bedeutung von Pilzen für den Menschen hat bis in die Gegenwart hinein kontinuierlich zugenommen. So werden heutzutage Amylasen nicht nur mit Hilfe des Pilzes *A. flavus* var. *oryzae*, sondern auch mit *Aspergillus niger* und *Trichoderma longibrachiatum* großtechnisch hergestellt (EU-RoFA 2012). Sie finden Anwendung in fast allen Bereichen des täglichen Lebens, angefangen bei der Herstellung von Futtermitteln für Nutztiere, im Backhandwerk, der Süßwarenindustrie, der Alkoholherstellung aber auch in der Textilherstellung oder bei Waschmitteln zur Entfernung stärkehaltiger Verschmutzungen.

Neben den vielen positive Errungenschaften waren und sind Pilze oft auch ein Fluch für die Menschheit. Schon das dritte Buch Mose beschreibt woran man Menschen, die

unter Hautpilz leiden, erkennen kann: „...die Haare an dieser Stelle hell geworden sind (möglicherweise Myzel und Sporen von *Candida* spp.) und die Hautveränderung tiefer zu gehen scheint,...“ (3. Buch Mose, 1445 v.Chr.-440 v.Chr., Kapitel 13, Vers 2). Auch der Umgang mit Pilzbefall in Häusern wird beschrieben; „Wenn er nun den Ausschlag besieht und findet, das an der Wand des Hauses grünliche oder rötliche Stellen sind, so soll er aus dem Hause herausgehen ... und das Haus für sieben Tage verschließen. Und wenn er am siebten Tage sieht, dass der Ausschlag weiter gefressen hat, so soll er die Steine ausbrechen lassen und hinaus vor die Stadt an einen unreinen Ort werfen.“ (3. Buch Mose, 1445 v.Chr.-440 v.Chr., Kapitel 14, Vers 37 bis 39)¹.

Trotz der langen Koexistenz von Menschen und Pilzen begann die systematische Einordnung der Pilze erst im 17. Jahrhundert. Der genaue Zeitpunkt für den Beginn dieser Arbeiten ist nicht feststellbar, wohl aber eine Erfindung, die die Grundlage für diese Arbeiten bildet und deren Entwicklung sich über einen langen Zeitraum erstreckte - das Mikroskop. Dem Niederländer Antoni van Leeuwenhoek (1632 - 1723) gebührt dabei eine besondere Erwähnung. Er beschrieb eine Vielzahl von mikroskopischen Beobachtungen aus allen Bereichen des täglichen Lebens und trug dadurch erheblich zum Verständnis und zur Akzeptanz des Mikroskops als wissenschaftliches Hilfsmittel bei. Ein Brief von ihm an die Royal Society in London beinhaltet die erste mikroskopische Beschreibung eines Konidiums von Schimmelpilzen: „...shoot out in the form of the stalks of vegetables, so as that some of those stalks appeared with round knobs at the end, some with blossom-like leaves.“ (Leeuwenhoek 1673). Über die Beschreibung des Sporenträgers ging van Leeuwenhoeks Interesse an Schimmelpilzen allerdings nicht hinaus.

Wenngleich viele Forscher dieser Zeit sich mit Pilzen beschäftigten, beließen es die meisten bei einer reinen Beschreibung der beobachteten Phänotypen. Einer der ersten Wissenschaftler, der sich um eine taxonomische Gliederung der Pilze bemühte, war der Botaniker Pier Antoni Micheli (1679-1737) aus Florenz. In seinem 1729 veröffentlichten Buch: „*Nova plantarum genera juxta Tournefortii methodum disposita*“ (deutsch: Neue Pflanzengattungen, geordnet nach der Methode von Tournefort; Micheli 1729) beschrieb und gruppierte er über 1900 Pflanzen und Pilzarten, wobei Pilze zu dieser Zeit den niederen Pflanzen zugeordnet wurden. Ein erheblicher Teil der Veröffentlichung

¹www.die-bibel.de/bibelwissen

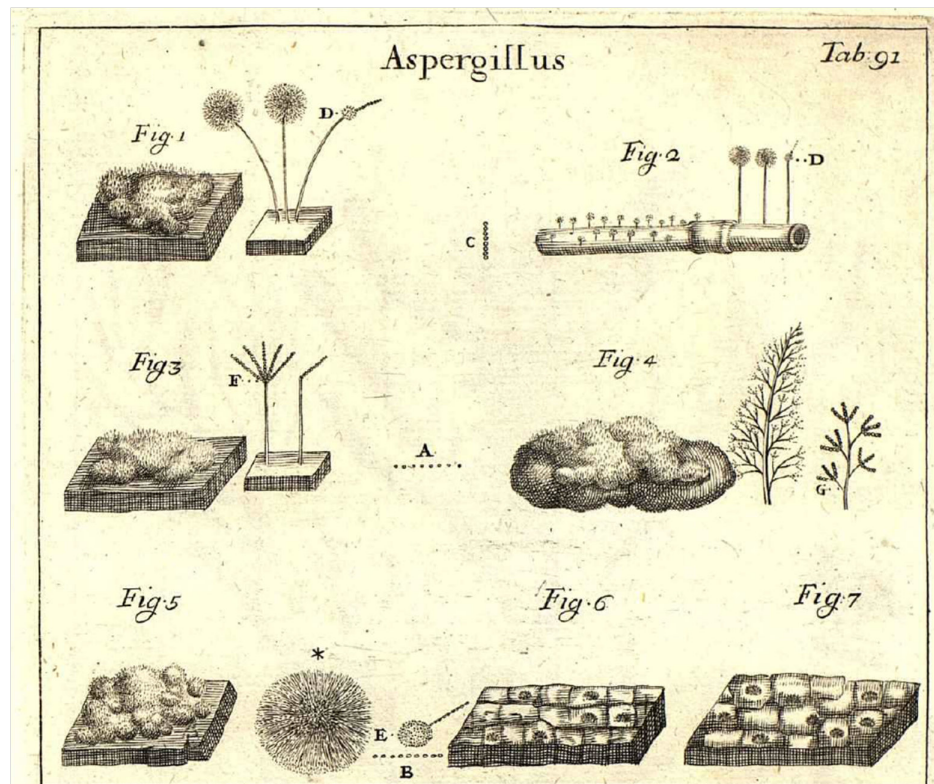


Abb. 1.1: Pier Antonio Michelis Illustration von *Aspergillus* Konidien und Myzel aus „Nova plantarum genera juxta Tournafortii methodum disposita.“
 Die Abbildung zeigt in Bereich Fig.1 sporulierendes Myzel, eine Detailaufnahme der runden Konidienträger (D) sowie eine einzelne Konidienkette (C). Fig.2 illustriert das senkrechte Herauswachsen des Konidienträgers aus einer Fußzelle sowie die runden Sporenköpfchen. Die Bereiche Fig.3 bis Fig.6 zeigen weitere Pilze, die Micheli den Aspergillen zuordnete.

waren Erstbeschreibungen, denen z.T. noch kein wissenschaftlicher Name zugeordnet worden war. Für seine Veröffentlichung war Micheli auf Spenden angewiesen und er bedankte sich bei den Spendern, indem er Gattungen bzw. Arten nach ihnen benannte. Die Gattung der Schwimmfarne (*Salvinia*) ist z.B. nach dem italienischen Philologen Antonio Maria Salvini benannt. Auch die Familie der Aspergillen bekam ihren Namen von Micheli, deren erstes Mitglied *Aspergillus niger* wurde (Abb. 1.1).

Micheli ordnete Organismen aufgrund äußerlicher Merkmale in gemeinsame Klassen ein. Diese Einordnung ist nicht immer exakt, sodass es bis heute zu Umbenennungen und Neugruppierungen kommt. Viele Pilze besitzen darüber hinaus zwei Entwicklungszyklen die als telomorph und anamorph bezeichnet werden. Die Morphologie dieser Wuchsformen weichen zum Teil erheblich voneinander ab, sodass sie für unterschiedliche Pilze gehalten und verschiedenen Familien zugeordnet wurden.

1.2 Der filamentöse Schimmelpilz *Aspergillus niger*

A. niger war der erste beschriebene Pilz seiner Familie und somit Namensgeber. Er erhielt seine Bezeichnung aufgrund der morphologischen Analogie des Konidiophors zum Aspergillum, dem Weihwasserwedel der katholischen Kirche (Abb. 1.2). Das Genom von *A. niger* wurde bisher dreimal sequenziert und annotiert. Für die Analyse wurden drei verschiedene Stämme, zwei Wildtyp (NRRL3 und ATCC 1015) sowie ein Abkömmling eines mutierten Stammes (CBS518.33) verwendet (Semova *et al.* 2006, Baker 2006, Pel *et al.* 2007). Den daraus hervorgehenden Daten nach besitzt *A. niger* eine Genomgröße zwischen 33,7 und 38,5 MB mit 11200 bis 14000 Genen, die sich auf 8 Chromosomen verteilen.

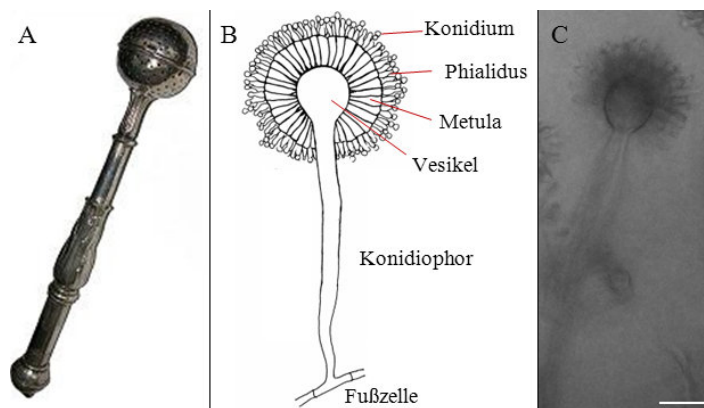


Abb. 1.2: Die Morphologie der Konidienträger ist das gemeinsame Hauptmerkmal aller Arten der Gattung *Aspergillus*. Das Aspergillum der katholischen Kirche²(A) ist Namensgeber der Familie. Alle Mitglieder der Aspergillen zeichnen sich durch einen vergleichbaren Aufbau des Konidiophors aus (B, Carrillo 2003). Mikroskopische Aufnahme eines Konidiophores von *A. niger* (C). Größenstandard: 10 µm.

Die Gattung der Aspergillen ist sehr heterogen, viele ihrer Vertreter besitzen sowohl einen sexuellen als auch einen asexuellen Lebenszyklus, wie z.B. *Aspergillus nidulans* (*Emericella nidulans*) oder *Aspergillus equitis* (*Eurotium cristatum*). Für *A. niger* ist bisher ausschließlich die asexuelle Vermehrung beschrieben, bis heute konnten keine Bedingungen gefunden werden, bei denen sich Kleistothezien, die Fruchtkörper der Aspergillen, bilden. Aus diesem Grund wurde *A. niger* zusätzlich den Fungi imperfecti (Deuteromycota) zugeordnet, einer Gruppe von filamentösen Pilze, für die nur die anamorphe Lebensweise beschrieben ist.

²www.amtage.de/Domschatz_Minden/Domschatz_Weihwasser/domschatz_weihwasser0103.jpg

Trotz dieser Einschränkung ist *A. niger* in der Lage Gene durch Rekombination auszutauschen. Der Vorgang, der ihm das ermöglicht, wird als Parasex bezeichnet (Abb. 1.3, Pontecorvo 1956). Dabei handelt es sich nicht um eine sexuelle Vermehrung, da zum einen keine hierfür spezifischen Strukturen wie Protoperithezien ausgebildet werden und zum anderen keine meiotische Teilung stattfindet. Der parasexuelle Lebenszyklus wird durch die Verschmelzung zweier homokaryotischer, haploider Hyphen von unterschiedlichen Stämmen eingeleitet, die keine heterokaryotische Inkompatibilität aufweisen. Daran anschließend kann es zur Karyogamie kommen, wodurch neben den zwei Arten von haploiden auch diploide Zellkerne im Zytoplasma vorliegen. Innerhalb der diploiden Kerne kann es anschließend zum Genaustausch kommen. Die Rekombination findet allerdings deutlich seltener als während der sexuellen Vermehrung statt, da die Chromosomen u.a. nicht entsprechend gepaart vorliegen (Deacon 2005). Die Stabilität der diploiden Kerne ist nicht sicher beschrieben. In einigen Veröffentlichungen werden sie als relativ stabil beschrieben, wobei die betroffenen Stämme ein normales vegetatives Wachstum aufweisen (Timberlake 1990a, Upshall 1981). Durch Fehlsegregationen können einzelne Chromosomen während der mitotischen Teilungen verlorengehen, sodass die Kerne mit der Zeit wieder haploid werden (Pontecorvo 1956, Clutterbuck 1996). Die Bedeutung von Parasex für Pilze in der Natur ist weitestgehend unbekannt.

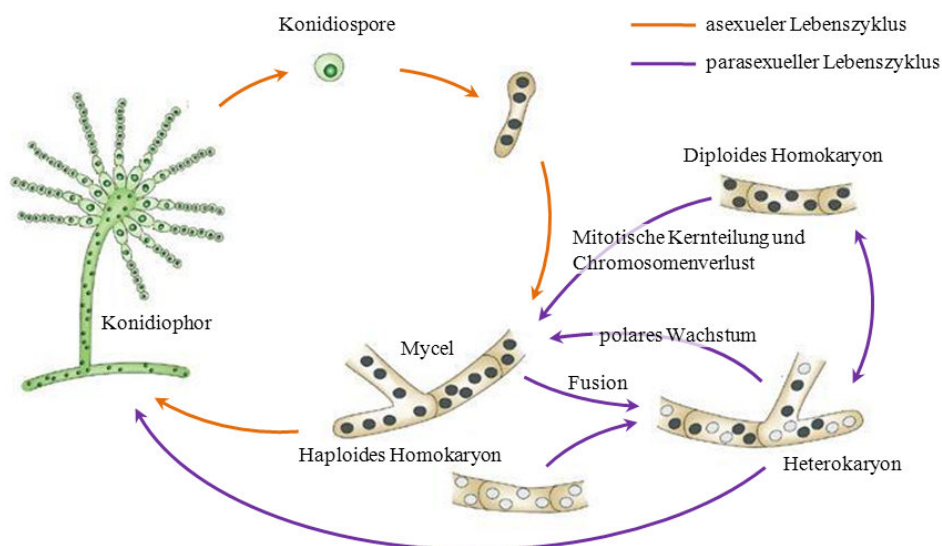


Abb. 1.3: Der vegetative Lebenszyklus von *A. niger* besteht aus Konidiosporen, die zur Verbreitung beitragen, Keimlingen sowie Hyphen. Aus dem Hyphengeflecht gehen Konidiophore hervor, die neue Konidien produzieren. *A. niger* ist in der Lage, seine Chromosomen während des parasexuellen Lebenszykluses zu rekombinieren, eine sexuelle Vermehrung ist unbekannt. Abbildung in Anlehnung an Casselton und Zolan (2002).

Es wird aber vermutet, dass dessen Beitrag stark von den Eigenschaften der Pilze abhängt, z.B. ihrer Fähigkeit zur sexuellen Vermehrung. Entsprechend gibt es auch Pilze, die überhaupt nicht zur parasexuellen Rekombination befähigt sind (Deacon 2005, Goodwin *et al.* 1994). Ein aktiver Prozess, bei dem sich das heterokaryotische Myzel zu einem homokaryotischen auf trennt, ist nicht bekannt (van Diepeningen *et al.* 1997). Das die meisten Isolate von *A. niger* trotzdem homokaryotisch sind, beruht daher wahrscheinlich auf zwei Eigenschaften des Pilzes. Zum einen enthalten die Konidien von *A. niger* ausschließlich einen Kern, die Nachkommen sind demnach immer homokaryotisch, zum anderen ist es darüber hinaus möglich, dass es durch das polare Wachstum der Spitzen der Hyphen und Stengel mit der Zeit zu einer Homokaryisierung des Myzels kommt.

1.2.1 Die Konidienbildung in Aspergillen

Die Differenzierung von polar wachsenden Myzel zu einem vollständig ausgeprägten Konidienträger ist sehr wahrscheinlich der am stärksten regulierte und komplizierteste Prozess im Lebenszyklus von *A. niger*. Die ersten Schritte finden dabei schon in wenigen Stunden alten Hyphen mit der Bildung einer verdickten Fusszelle statt, aus der eine Hyphe entgegen der Schwerkraft herauswächst (Abb. 1.4 A). Nach wenigen Stunden hat diese Lufthyphe ihre Zielhöhe erreicht, woraufhin sie das Höhenwachstum einstellt. Für die Konidiophore einiger Aspergillen ist interessanterweise eine konstante Wuchshöhe beschrieben, die nur wenig von äußeren Faktoren wie der Nährstoffversorgung beeinflusst wird. Es ist daher anzunehmen, dass die Wuchshöhe der Stiele genetisch festgeschrieben ist (Clutterbuck 1969).

Durch Einlagerung von Membranvesikeln aus dem Zytoplasma in die Zellmembran kommt es im Anschluss an das filamentöse Wachstum zur Verdickung der Spitze des Konidiophores. Diese Verdickung wird ebenfalls als Vesikel bezeichnet. Diese Vesikel sind zumeist haploid und homokaryotisch, selbst wenn das Myzel heterokaryotisch ist. Dies wird zum einen durch die wiederholten Kernteilungen während des Stielwachstums, zum anderen aber auch durch mehrere Proteine, die die Kernbewegungen und Anordnung steuern, geregelt (Fischer und Timberlake 1995).

Im Anschluss an die Vesikelbildung kommt es zur synchronen Bildung von kleinen Ausstülpungen auf der gesamten Oberfläche des Vesikels, die als primäre Sterigmata

oder Metulae bezeichnet werden. Parallel dazu kommt es im Vesikel zu einer Vielzahl von mitotischen Kernteilungen (Clutterbuck 1969, Oliver 1972). Diese Kerne werden unterhalb der Metulae positioniert und während einer, mehr oder weniger synchronen, finalen Kernteilung gelangt ein Tochterkern in die Metulae, wohingegen der andere Kern im Vesikel verbleibt (Mims *et al.* 1988). Dass dieser Schritt essentiell ist und die Kerne nicht zufällig in die Metulae gelangen, konnte durch Positionierungsmutanten gezeigt werden, bei denen die für die Kernpositionierung verantwortlichen Proteine fehlten. Nach der Einlagerung eines Kernes je Metulae werden diese gegenüber dem Vesikel mit Septen bis auf ein Pore hin verschlossen.

Im weiteren Verlauf bildet sich aus der Spitze der Metulae eine Knospe, aus der sich eine sporenbildende Phialide entwickelt. Hierfür teilt sich der Kern der Metulae und je ein Tochterkern verbleibt in einem der Kompartimente. Die Phialiden bleiben auch nach Abschluss der Entwicklung durch unvollständige ausgeprägte Septen mit dem Metulae verbunden, sodass ein zytoplasmatischer Austausch zwischen Phialiden, Metulae und dem Vesikel weiterhin möglich ist. Je nach Art kann es auch zur Bildung mehrerer Phialiden je Metulae kommen.

In den Phialiden findet abschließend die eigentliche Sporenbildung durch wiederholte Kernteilung und Herausschieben der Konidien statt. Hierfür bildet sich zuerst eine Ausstülpung an der Spitze der Phialide, zu welcher der Zellkern wandert. In deren Nähe angekommen, teilt sich der Kern. Ein Tochterkern wandert anschließend in das sich bildende Konidium, der andere wieder zurück in die Phialide Richtung Metulae. Der Zellkern im Konidium verharret nach der Teilung in der G₁-Phase. Hat das Konidium seine volle Größe erreicht, kommt es zu einer radialen Einstülpung der Zellmembran zwischen Konidium und Phialide sowie zur Anlagerung von Zellwandbestandteilen. Die zytoplasmatische Trennung erfolgt dabei nicht sofort, sie tritt erst nach einiger Zeit durch das Anwachsen der Zellwand ein. Nach der vollständigen Trennung kommt es zur Reifung der Konidien. Dieser in mehrere Phasen unterteilte Prozess beschreibt vor allem die Kondensation der bestehenden sowie die Bildung von neuen Schichten um die noch unreife Spore (Abb. 1.4 B). Es wird angenommen, dass neben der Schutzfunktion die Bildung dieser Schichten auch für die Ruhephase, die den Sporen hilft große Zeitspannen zu überdauern, verantwortlich ist (Sewall *et al.* 1990a).

Da die Sporenbildung vom Myzelalter abhängig ist und es sich dabei um aufeinander-

der aufbauende Prozesse handelt, war es zunächst sehr schwer, biochemische Analysen durchzuführen, da zu jedem Probenzeitpunkt eine Vielzahl an unterschiedlich entwickelten Konidiophoren vorlagen. Aus diesem Grund wurden Methoden gesucht, die eine synchrone Entwicklung des Myzels ermöglichen, sodass alle Konidiophore den gleichen Entwicklungsstand aufweisen. Die Lösung für dieses Problem erfolgte durch das Zusammenführen mehrerer Beobachtungen: Zum einen bilden Aspergillen in Flüssigkultur, solange sie genügend Nährstoffe vorfinden, zwar Myzel, differenzieren aber nicht und bilden folglich keine Konidiophore. Für deren Bildung benötigt das Myzel einen dauerhaften Zugang zu Luft (Champe *et al.* 1981, Law und Timberlake 1980). Zum anderen muss das Myzel der Aspergillen ein Mindestalter aufweisen, bevor die Bildung von Konidiophoren eingeleitet wird (Axelrod *et al.* 1973). Kombiniert man die beiden Erkenntnisse, ist die Anzucht von synchronisiertem Myzel möglich. Dabei werden Sporen z.B. auf Agarplatten ausplattiert und mit Flüssigmedium überschichtet. Nachdem sich das Myzel ausreichend weit entwickelt hat, bei *A. nidulans* dauert dies mindestens 20 Stunden, wird das Flüssigmedium abgegossen, das gesamte Myzel auf dem Festmedium erhält zum gleichen Zeitpunkt Zugang zur Luft und die Konidiophorentwicklung setzt in der gesamten Kolonie synchron ein (Axelrod 1972, Law und Timberlake 1980, Yager *et al.* 1982, Timberlake 1990b).

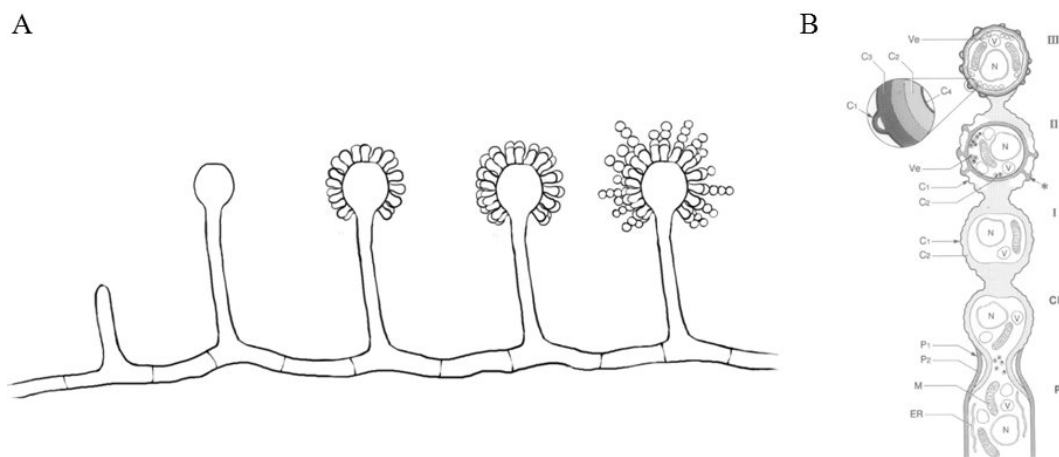


Abb. 1.4: Die Konidiophorentwicklung der Aspergillen ist in fünf Schritte unterteilt. Stielwachstum, Vesikel-, Metulae-, Phialiden- und Konidienbildung (A, von Stephanie Herzog). Die Konidienbildung stellt selbst ebenfalls einen mehrstufigen Prozess dar, in dessen Verlauf die Spore ihre äußere schützende Hülle erhält und reift (B, aus Sewall *et al.* 1990a).

1.3 Industrielle Bedeutung von *Aspergillus niger*

1.3.1 Einsatzbereiche und biotechnologische Anwendungen

Filamentöse Pilze werden seit langer Zeit von Menschen bei biotechnologischen Anwendungen eingesetzt. Aufgrund ihrer saprophytischen Lebensweise finden sie dabei unter anderem bei der Dekontamination von verseuchten Böden, der Herstellung von regenerativen Energien, sowie zunehmend auch bei der Produktion von Lebensmitteln Verwendung (Maeda *et al.* 2005, Sumathi und Manju 2000).

Eine Voraussetzung für diesen Einsatz als Lebensmittel oder Arznei ist der GRAS (generally recognized as safe) Status. Die Einteilung erfolgt Erzeugnis- und Organismus-spezifisch, muss also für jedes neue Produkt oder, wenn das gleiche Produkt in einem anderen Organismus produziert werden soll, neu bei der amerikanischen Lebensmittelaufsicht (FDA; Food and Drug Administration) beantragt werden. Viele Produkte, die mit Hilfe von filamentösen Pilzen, so auch mit *A. niger*, produziert werden, haben diese Einstufung und können daher als Nahrungsmittel oder in Medikamenten eingesetzt werden.

Die saprophytische Lebensweise der filamentösen Pilze bietet darüber hinaus den Vorteil, dass als Energiequelle Abfallprodukte aus anderen Produktionsprozessen, wie z.B. Melasse als Nebenprodukt der Zuckerherstellung oder Hopfenabfälle aus der Bierproduktion, verwendet werden können. Außerdem besitzen die Pilze ein leistungsfähiges Sekretionssystem, was vor allem für viele biotechnologische Anwendungen eine große Erleichterung bei der Aufreinigung der Produkte darstellt, da diese direkt in das umgebende Medium abgegeben werden (Conesa *et al.* 2001).

Neben der Namensgebung gebührt *A. niger* auch die Ehre, als erster filamentöser Pilz in einem großtechnischen Produktionsverfahren eingesetzt worden zu sein. Das Verfahren diente der Herstellung von Zitronensäure und wurde in den zwanziger Jahren des 20. Jahrhunderts entwickelt und patentiert (Currie 1917, Perlman *et al.* 1946). Durch Weiterentwicklungen werden bei diesem Prozess heute bis zu 80% der rechnerisch möglichen Ausbeute erreicht (Magnuson und Lasure 2004). Zitronensäure findet u.a. als Säuerungs- und Konservierungsmittel in der Lebensmittelindustrie, in Blutkonserven als Gerinnungshemmer, zum Beizen von Stoffen und in Reinigungsmitteln als Entkalker eine Anwendung. Neben Zitronensäure sind Gluconsäure, Itaconsäure und

Milchsäure weitere industriell bedeutende Säuren, die mit Hilfe von Pilzen hergestellt werden. Die genannten Chemikalien werden den Bulkchemikalien zugeordnet, da sie die Ausgangsstoffe für viele chemische Synthesen darstellen. Gluconsäure wird z.B. als Färbe- und Stabilisierungsmittel in Lebensmitteln eingesetzt und findet Anwendung in Medikamenten bei Eisenmangel. Itaconsäure und Milchsäure werden u.a. bei der Herstellung biologisch abbaubarer Kunststoffe verwendet.

Aufgrund der langjährigen Erfahrung mit der Synthese von Enzymen und Grundchemikalien werden filamentöse Pilze auch für die heterologe Proteinproduktion eingesetzt (Schmidt 2004). Enzyme, die mit Hilfe von filamentösen Pilzen hergestellt wurden, haben in medizinischen Bereichen den Vorteil, dass die Glykosylierungsmuster der Proteine deutlich mehr denen von Säugetieren entsprechen, als die Glykosylierungsmuster der gleichen Proteine exprimiert von Hefen oder Bakterien. Für die Verträglichkeit und Aktivitätsdauer von medizinisch eingesetzten Enzymen im Blutkreislauf ist dies von großer Bedeutung. Entsprechend gab es bereits verschiedene Ansätze menschliche Proteine in filamentösen Pilzen zu produzieren (Devchand und Gwynne 1991, Maras *et al.* 1999, Punt *et al.* 2002, Punt *et al.* 2011, Ward 2012). Es zeigte sich dabei allerdings, dass die Effektivität der heterologen Proteinexpression und -sekretion deutlich hinter den Erwartungen zurückblieb (Wiebe *et al.* 2001, Joosten *et al.* 2003). So beträgt die Ausbeute der *A. niger* Glucoamylase 20 g/l (Finkelstein 1987), die heterologe Expression des humanen Interleukin 6 in *A. niger* aber nur 0,14 g/l (Punt *et al.* 2002). Eine Übernahme bisheriger Expressions- und Kultivierungsbedingungen ist ohne entsprechende Anpassungen für die heterologe Proteinproduktion daher nicht möglich.

1.3.2 Produktivität - Einflüsse und Abhängigkeiten

Filamentöse Pilze besitzen ein breites Spektrum an Wachstumsmorphologien. Sie wachsen auf festem Untergrund als Kolonie, submers in Form von viskosem Myzel, Pellets (kugelförmige Partikel) sowie als Biofilm oder, in Standkultur, schwimmend als Myzelmatte auf flüssigem Medium (Elander 2003, Papagianni 2004).

Es ist seit langer Zeit ein Ziel der Biotechnologie, Produktionsprozesse hinsichtlich einer maximalen Ausbeute zu optimieren. Dabei wurde der Zusammenhang zwischen Morphologie und Ausbeute oftmals vernachlässigt, sodass Aussagen über allgemeine Korrelationen nicht möglich sind (Grimm *et al.* 2005b). Als Folge müssen bis heute für

viele neue Produkte die optimalen Produktionsbedingungen erst ermittelt werden. Ein ubiquitär gültiger Lösungsweg der Rückschlüsse auf generelle Effekte erlaubt, hat sich bei diesen Arbeiten bisher allerdings nicht offenbart. So erreicht man bei der Produktion von Zitronensäure mit *A. niger* Pellets die beste Ausbeute (Papagianni *et al.* 1998), dagegen ergab sich für die Penicillinherstellung ein Optimum bei der Kultivierung von *Penicillium chrysogenum* als freies Myzel (Elander 2003).

Die Optimierung von biotechnologischen Verfahren ist ein sehr langwieriger Prozess. Dabei müssen viele Parameter wie die Art und Konzentration der Nährstoffe, die Animpfkonzentration, der pH-Wert, der Energieeintrag durch Rühren, Temperatur und Begasung sowie der Einsatz von Spurenelementen und Zusatzpartikeln berücksichtigt werden. So wird z.B. durch einen basischen pH-Wert zu Beginn einer *A. niger* Kultivierung in Rührreaktoren ein myzelartiges, durch einen sauren pH-Wert dagegen ein pelletartiges Wachstum gefördert (Gibbs *et al.* 2000, Papagianni 2004).

Die submerse Kultivierung in Bioreaktoren ist gegenwärtig das am häufigsten verwendete biotechnologische Produktionsverfahren. Wird dabei ein myzelartiges Wachstum forciert, zeichnet sich dieses durch eine Strukturviskosität aus. Der Konzentrationsausgleich im Medium erfolgt dabei oft ausschließlich über Diffusion, sodass einige Bereiche nur unzureichend mit Nährstoffen versorgt werden und Totzonen im Reaktor entstehen. Wird dagegen das Pelletwachstum in Bioreaktoren gefördert, kann man insgesamt von einem Newton'schen Fließverhalten ausgehen. Im Gegensatz zum homogenen Gesamtansatz zeigen die Pellets selbst aber eine sehr heterogene Struktur als auch Nährstoffversorgung (Enshasy *et al.* 1999). Dabei sind die äußeren Bereiche metabolisch sehr aktiv, wohingegen die inneren Bereiche ab einer bestimmten Pelletgröße aufgrund von Sauerstoffmangel absterben (Hille *et al.* 2005, Huang und Bungay 1973, Wittier *et al.* 1986). Ein weiterer Nachteil der Pelletproduktion in Rührreaktoren sind hohe Scherkräfte, denen das Myzel, vor allem die Hyphenspitzen, permanent ausgesetzt sind. Der Pilz wendet während solcher Kultivierungen daher einen Großteil der ihm zur Verfügung stehenden Energie für die Reparaturen der beschädigten Hyphen auf.

Aufgrund der genannten Nachteile können andere Kultivierungsmethoden effektiver sein. So wurde Zitronensäure anfangs im Oberflächenverfahren erzeugt. Bei diesem Verfahren schwimmt eine Myzelmatte auf dem Nährmedium und gibt das Endprodukt in dieses ab (Rehm 1980). *A. niger* wird bei diesem Verfahren keinem mechanischen Stress

ausgesetzt. Da diese Bedingungen aber optimal für seine asexuelle Vermehrung sind, setzt der Pilz einen Großteil der ihm zur Verfügung stehenden Energie zur Konidiophor- und Konidienbildung ein. Alternativ ist auch eine Nutzung von Biofilmen möglich. Bei dieser Kultivierungsmethode haftet Myzel submers an einem festen Untergrund. Das Verfahren bietet den Vorteil, dass zum einen kein mechanischer Stress auf das Myzel wirkt und zum anderen die Sporenbildung unterdrückt wird.

1.3.3 Biofilm - Eine alternative submerse Kultivierungsform

Biofilme versprechen für viele Produktionsverfahren signifikant höhere Ausbeuten als mit Hilfe von Pellets in konventionellen Rührreaktoren bisher erreicht werden konnte. So stieg die Zellulaseaktivität in *A. niger* Kulturen zwischen 70% und 200% unter Biofilm fördernden Kultivierungsbedingungen gegenüber der Pelletproduktion. Gleichzeitig blieb die Biomassebildung der Biofilme z.T. deutlich hinter der Biomasse der Pellets zurück, was vor allem positive Auswirkungen auf den Netto-Energieverbrauch, der ebenfalls hinter dem der Pelletkultivierung zurückbleibt, hat (Villena und Gutiérrez-Correa 2006, Villena und Gutiérrez-Correa 2007).

Die Vorteile von Biofilmen gegenüber Pellets können vor allem in den abnehmenden Scherkräften während der Kultivierung gesehen werden. So kommt es in Rührreaktoren ständig zu Zusammenstößen der Pellets untereinander oder mit der Reaktorperipherie, sodass der Pilz permanent gezwungen ist, einen Teil der ihm zur Verfügung stehenden Energie für Hyphenreparaturen aufzuwenden. Da die Sekretion von Proteinen und chemischen Verbindungen bei filamentösen Pilzen zumeist an den Hyphenspitzen erfolgt, wirkt sich die Beschädigung der Hyphenspitzen außerdem auf die Effizienz der Produktsekretion aus. Alle diese negativen Einflüsse können, je nach Durchführung, bei Biofilmkultivierungen vermieden werden.

Dabei ist anzumerken, dass viele Kultivierungsverfahren unter dem Begriff Biofilme zusammengefasst werden. So gibt es Ansätze, die ein poröses Trägermaterial als Wachstumsoberfläche zu Rührreaktor-Kultivierungen hinzufügen, an dem sich die Sporen und später das ganze Myzel anheften. Dieses Verfahren hat den Nachteil, dass es weiterhin zu Kollisionen zwischen den Partikeln kommt (Gamarra *et al.* 2010). Andere Ansätze verwendeten einen Polyesterstoff, an dem sich die Sporen anlagern und der im weiteren Entwicklungsverlauf vom Pilzmyzel vollständig durchwachsen wird, sodass sich ein

Kunststoff-Pilzgeflecht bildet (Villena und Gutiérrez-Correa 2006).

Die Adhäsion von Sporen und Myzel an ihren Trägeroberflächen ist dabei in allen Verfahren zu beobachten. Sie wird durch die Sekretion von extrazellulärem Material vermittelt, was bereits mehrfach durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt werden konnte (Villena und Gutiérrez-Correa 2006, Gamarra *et al.* 2010).

Einen großen Nachteil besitzt allerdings auch die Biofilmproduktion. Da das Myzel nicht aufhört zu wachsen, solange ihm genügend Nährstoffe zugeführt werden, nimmt die Schichtdicke des Biofilms kontinuierlich zu. Aus diesem Grund kommt es, wie schon für Pellets beschrieben, mit zunehmendem Biofilmalter zu Bereichen ohne Zugang zu Nährstoffen und somit zum Absterben und Auflösen des Biofilms. Eine Lösung dieses Problems wäre eine Inhibierung des Wachstums ab einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung der Produktion und Sekretion des gewünschten Produkts. Solange diese Probleme nicht gelöst sind, wird sich das Biofilm-Verfahren nicht gegen die seit langem etablierte submerse Pelletkultivierung in Rührreaktoren durchsetzen.

1.3.4 Modell der Pelletbildung

Pellets stellen die häufigste Produktionsform in Bioreaktoren da, wobei sich gezeigt hat, dass die Morphologie einen direkten Einfluss auf die Produktivität hat (Kelly *et al.* 2004, Hille *et al.* 2005). Es ist daher ein Ziel der Biotechnologie, die Morphologie der Pilze an den jeweiligen Produktionsprozess anpassen zu können. Für die Pelletbildung hat sich gezeigt, dass deren Entwicklung in mehrere Schritte unterteilt werden kann, wobei angenommen wird, dass jede Beeinflussung der einzelnen Entwicklungsschritte eine Auswirkung auf die endgültige Morphologie haben kann.

Im Flüssigmedium werden die Sporen von filamentösen Pilzen in koagulativ und nicht-koagulativ unterteilt. Nicht-koagulative Sporen agglomerieren nicht, wohingegen koagulative Sporen in der ersten Phase der Kultivierung miteinander interagieren und Sporenagglomerate unterschiedlicher Größe bilden (Metz und Kossen 1977). Diese Zusammenlagerungen sind reversibel, d.h. Sporen können sich aus den Agglomeraten lösen und große Zusammenlagerungen können in kleinere zerfallen (Abb. 1.5). Daher stellt sich mit der Zeit ein dynamisches Gleichgewicht zwischen sich anlagernden und ablösenden Sporen ein, wodurch die Partikelzahl ab einem bestimmten Zeitpunkt kon-

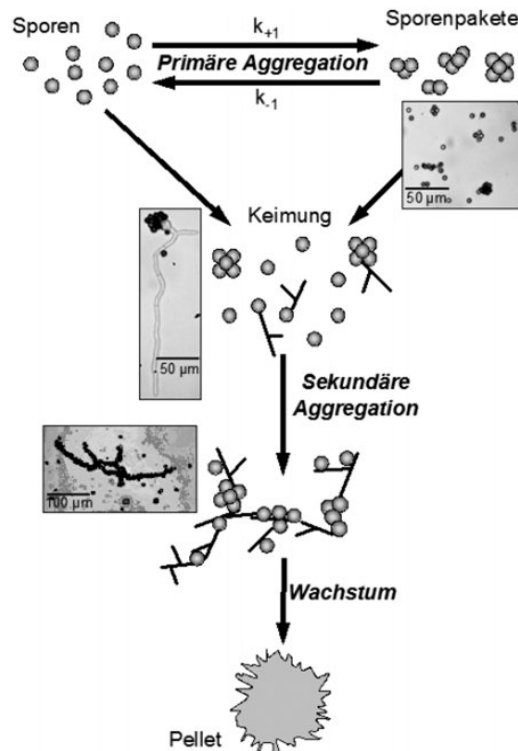


Abb. 1.5: Modell zur Pelletbildung in Flüssigkultur. Im ersten Schritt kommt es zu einer reversiblen Zusammenlagerung von Sporen bis zur Einstellung eines Gleichgewichts. Der zweite Schritt wird durch die Sporenkeimung eingeleitet und ist geprägt vom weiteren Anwachsen und Verhaken der Agglomerate zu untrennbaren Aggregaten. Anschließend entwickeln sich die Aggregate durch Wachstum zu Pellets. Abbildung nach Kelly *et al.* 2006.

stant bleibt (Grimm *et al.* 2005a). Die Einteilung der Sporen in die zwei Gruppen ist allerdings fraglich, da Interaktionen auch von der Animpfkonzentration oder dem pH-Wert abhängig sein können (Gerin *et al.* 1993). Die zweite Phase der Pelletbildung wird durch das Keimen der Sporen eingeleitet. Ab dem Beginn der sekundären Sporennagglomeration kommt es neben den Sporen- auch zu Sporen-Hyphen- und Hyphen-Hyphen-Interaktionen. Im Laufe der zweiten Phase entwickeln sich außerdem aus den relativ lockeren Agglomeraten Aggregate, die fest miteinander verbunden sind (Grimm 2006, Kelly *et al.* 2006). Die sekundären Aggregate entwickeln sich nach Abschluss der zweiten Phase zu Pellets. Die Pelletzahl ist somit direkt von der Anzahl der sekundären Aggregate abhängig.

1.3.5 Die primäre Sporenaggregation

Die Anlagerung von Sporen an andere Sporen, Hyphen oder Substrate wird durch physikochemischen Oberflächeninteraktionen beeinflusst. Wichtige Parameter bei diesem Prozess sind die Hydrophobizität und die Oberflächenladung der Sporen, aber auch

Glykoproteine, Polysaccharide und Lipide haben einen Einfluss auf die Effektivität der Zusammenlagerung (Cole *et al.* 1979).

Sporenoberflächen sind meist sehr hydrophob, da sich hier spezielle Proteine befinden, die Hydrophobine. Die wasserabweisende Oberfläche ermöglicht es den Sporen an hydrophoben Oberflächen zu haften, Hydrophobine spielen daher z.B. für *Magnaporthe grisea* beim Befall von Pflanzen eine wichtige Rolle (Kim *et al.* 2005).

Von Interesse für biotechnologische Anwendungen ist der Nachweis, dass Hydrophobine einen Einfluss auf das submerse Wachstum myzelbildender Pilze haben. Es wird daher vermutet, dass Hydrophobine auch die primäre Sporenagglomeration beeinflussen können und dies wiederum Auswirkungen auf die abschließende Pelletmorphologie haben kann (Grimm 2006, Kelly *et al.* 2006). Dieser Hypothese liegen dabei neben Messdaten auch theoretische Gedanken zugrunde, da die genauen Mechanismen der Zusammenlagerung von Sporen unbekannt sind. Viele dieser Daten basieren allerdings auf Analysen die ausgehend von der makroskopischen Morphologie auf das Agglomerationsverhalten der Sporen schließen (Amanullah *et al.* 2001). So wurde das Verhältnis von freiem Myzel zu Pellet-Biomasse eines submers kultivierten *A. nidulans* Wildtyps mit dem einer Doppelmutante verglichen, die nicht mehr in der Lage war, die Sporenoberflächen-Hydrophobine DewA und RodA zu bilden. Der Wildtyp bildete in diesem Vergleich deutlich mehr Biomasse in Pelletform als die Mutante, was auf die verbesserte Sporenagglomeration des Wildtyps zurückgeführt wurde (Dynesen und Nielsen 2003). Andere Veröffentlichungen gehen noch weiter und deuten an, dass die Sporenagglomeration in Bioreaktoren hauptsächlich auf der Expression der Hydrophobine beruht (Ryoo und Choi 1999). Hydrophobine werden allerdings nicht nur bei der Sporenbildung, sondern auch in vegetativ wachsenden Hyphen exprimiert und vermitteln dort die Haftung zwischen Myzel und Oberfläche. Die exprimierten Hydrophobine können sich dabei je nach Entwicklungsstand der Kolonie voneinander unterscheiden (Wösten 2001).

Der Einfluss der Hydrophobine auf die Sporenagglomeration ist aber auch umstritten. So gibt es Veröffentlichungen, die eine stärkere Abhängigkeit der Sporenzusammenlagerung von Polysacchariden, die mit der Sporenzellwand verbunden sind, sehen (Gerin *et al.* 1993). Weitere Untersuchungen bei unterschiedlichen pH-Werten zeigen darüber hinaus, dass auch elektrostatische Abstoßungskräfte in die Sporenagglomeration invol-

viert sind (Bowen *et al.* 2000).

Elektrostatische Ladungen der Sporenoberflächen könne z.B. durch Melanin verursacht werden. Bei Melanin handelt es sich um einen weiteren Bestandteil der Sporenoberfläche von Aspergillen. Es befindet sich in der äußeren Hülle der Sporen und schützt sie u.a. vor UV-Strahlung. Bei pH 7,0 ist Melanin negativ geladen, es kann pH-Wert abhängig aber auch neutral oder positiv geladen sein. Die elektrostatischen Eigenschaften von Sporen können demnach durch Einstellen eines bestimmten pH-Wertes manipuliert werden. Allerdings haben unterschiedliche pH-Werte nicht nur einen Einfluss auf die Oberflächenladung, sondern auch auf die Keim- und Lebensfähigkeit von Sporen. Somit wäre die Variation dieses Parameters allein nicht die geeignete Möglichkeit, die Sporenagglomeration zu manipulieren und ihren Beitrag zur Pelletbildung in *A. niger* zu überprüfen. Im Gegensatz zu Hydrophobinen und Polysacchariden wird Melanin in *A. niger* nicht in vegetativ wachsenden Hyphen exprimiert, außerdem wird die Melaninhülle schon während der Keimung abgeworfen (Tsukahara 1968, Tronchin *et al.* 1995) und hat folglich schon auf die sekundäre Sporenagglomeration und die Entwicklung von Keimlingen keinen direkten Einfluss mehr. Durch diese Eigenschaften könnte Melanin einen interessanten Manipulationspunkt für die Untersuchung der primären Sporenagglomeration darstellen.

1.4 Melanin

1.4.1 Bedeutung und Synthese von Melanin in *Aspergillus niger*

Viele Pilze produzieren charakteristische Pigmente, welche bis zu einem gewissen Grad spezifisch für eine Spezies sind. Ein typisches Merkmal von Aspergilli der Sektion Nigri sind die oliv- oder dunkelbraun bis schwarz gefärbten Konidiosporen (Samson *et al.* 2007).

Die Färbung beruht auf der Einlagerung von Melanin, einem bräunlich bis schwarzen Polyketid (Ray und Eakin 1975). Dass je nach Art trotzdem definierte Farbvarianten auftreten, beruht auf qualitativ und quantitativ unterschiedlichen Ausgangsstoffen, die artspezifisch synthetisiert werden.

Im Allgemeinen korreliert die Produktion von Melanin mit der Sporenbildung, das Myzel selbst ist zumeist weißlich und enthält kein Melanin (Jørgensen *et al.* 2011).

Melanine gehören zu den stabilsten, unlöslichsten und widerstandsfähigsten biochemischen Verbindungen die es gibt (Jacobson 2000). Sie sind in der Lage, große Teile des elektromagnetischen Spektrums zu absorbieren und in Wärme umzuwandeln und dienen daher u.a. als Schutz vor UV-Strahlung. Aufgrund ihrer Struktur binden sie außerdem Radikale und chemisch aktive Substanzen wie Ionen, wodurch sie auch mit Medikamenten und Antibiotika interagieren und diese inaktivieren können (Jacobson 2000). Da sich Melanine wie eine Schale um Sporen legen, schützen sie diese auch schon aufgrund ihrer bloßen Anwesenheit vor Beschädigungen. Die Umschließung stellt aber auch eine Behinderung dar, sodass *Aspergillus*-Sporen ihre äußere, melaninhaltige Hülle während der Keimung abstoßen (Tronchin *et al.* 1995). In pathogenen Pilzen besitzen Melanine noch weitere Funktionen. Sie werden u.a. in Appressorien gebildet, wo sie an der Vermittlung der Haftung zwischen Pilz und Wirt beteiligt sind (Kubo *et al.* 1996, Perpetua *et al.* 1996, Hill 1992).

Melanine haben ein hohes molekulares Gewicht, sie entstehen durch oxidative Polymerisation phenolischer Substanzen. Für die Synthese von Melanin haben sich in Pilzen zwei Hauptwege etabliert.

Der DOPA-Melanin Weg mit Tyrosin als Substrat und Dihydroxyphenylalanin (DOPA) als Zwischenprodukt ist charakteristisch für Basidiomyzeten. Ascomyzeten dagegen synthetisieren Melanin aus Malonyl- oder Acetyl-Coenzym A wobei 1,8-Dihydroxynaphthalen (DHN) ein Zwischenprodukt darstellt (Bell und Wheeler 1986, Jacobson 2000). Der erste Schritt der Biosynthese stellt die Bildung von 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalen (1,3,6,8-THN) dar, der von einer Polyketidsynthase (PKS) katalysiert wird. Diese erzeugt im Idealfall ein lineares Pentaketid, welches sich durch zwei Ringschlüsse zu 1,3,6,8-THN umlagert (Tsai *et al.* 1999). Neben diesem idealen Syntheseweg sind aber auch weitere Synthesewege mit zusätzlichen Zwischenprodukten bekannt (Tsai *et al.* 2001). Von 1,3,6,8-THN ausgehend erfolgt eine Reduktion zu Scytalon, anschließend eine Dehydrierung zu 1,3,8-THN, gefolgt von einer erneuten Reduktion zu Vermelon, welches abschließend zum stabilen Zwischenprodukt DHN dehydriert wird (Tsai *et al.* 1998). Eine Laccase oxidiert anschließend DHN zu einem Chinon, einer instabilen Verbindung mit doppelbindigem Sauerstoff. Die Chinone reagieren spontan miteinander und bilden im letzten Schritt Melanin. Da für diese Reaktionen kein einheitliches Schema existiert und auch weitere Verbindungen zufällig eingebaut werden können, gibt es

keine allgemeingültige Strukturformel für Melanin (Jacobson 2000).

In verschiedenen Aspergillen müssen für die Synthese der Chinone unterschiedliche Wege existieren. Beispielsweise konnten keine orthologen Proteine der in *A. fumigatus* an der Synthese beteiligte HN-Reduktase, Dehydrogenase und Laccase in *A. niger* identifiziert werden. Ein weiterer Hinweis für eine Divergenz der Synthesewege ist, dass der Reduktase-Inhibitor Tricyclazol in *A. fumigatus* die Melanin-Biosynthese inhibiert, in *A. nidulans* aber keinerlei Auswirkungen auf diese zeigt (Tsai *et al.* 1998).

1.5 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen

Eine elementare Eigenschaft lebender Zellen ist die Fähigkeit sich an veränderte Lebensbedingungen anzupassen. Um diese - relativ einfach klingende - Leistung vollbringen zu können, bewältigen Zellen gleich mehrere Aufgaben: Zuerst müssen sie die Veränderung wahrnehmen, sie anschließend in die Zelle weiterleiten und bewerten und, als Konsequenz, eine zweckmäßige Reaktion auslösen.

Für die Wahrnehmung verschiedenster Umweltreize besitzen Zellen Rezeptoren, die einen spezifischen Reiz durch eine definierte Reaktion, beispielsweise eine Konformationsänderung, in das Zellinnere übertragen. Die Weiterleitung des extrazellulären Signals erfolgt u.a. mit Hilfe von mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen / MAK). Die Aufgabe der Kinasen beschränkt sich dabei nicht nur auf die Weiterleitung der Signale, sie bilden vielmehr ein Netzwerk, dass eine Vielzahl von externen Parametern berücksichtigt und eine spezifische Zellantwort auslöst. Ein besonderes Merkmal der Kaskaden ist, dass sowohl der Aufbau als auch die Bestandteile der Kaskade in allen Eukaryoten, von Pilzen bis zu den Säugetieren, hoch konserviert sind. (Bardwell 2005, Qi und Elion 2005, Saito 2010).

1.5.1 Aufbau von mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kaskaden

Den Hauptteil einer MAK-Kaskade bildet ein Modul aus drei übereinander angeordneten Kinasen. Innerhalb des Moduls werden MAP-Kinasen von MAK-Kinasen (MAKK) phosphoryliert und aktiviert (Abb.1.6). Zuvor wurden MAKK von den ihnen übergeordneten MAKK-Kinasen (MAKKK) phosphoryliert und aktiviert. Bemerkenswert ist dabei, dass bestimmte MAKK und MAKKK die Signaltransduktion in meh-

renen Signalwegen übernehmen können, innerhalb eines Signalweges die Weiterleitung der Signale vom Stimulus bis zur Reaktion aber spezifisch bleibt.

Da Kinasen hoch konservierte Bereiche aufweisen, sind sie in allen Organismen leicht zu identifizieren. Im Gegensatz dazu sind die übergeordneten Rezeptoren und regulatorisch wirkenden Proteine nicht im gleichen Maße konserviert und daher oft, wie auch für *A. niger*, unbekannt. Das gleiche gilt für die den MAP-Kinasen nachgeschalteten Proteinen, die die eigentliche Zellantwort auslösen.

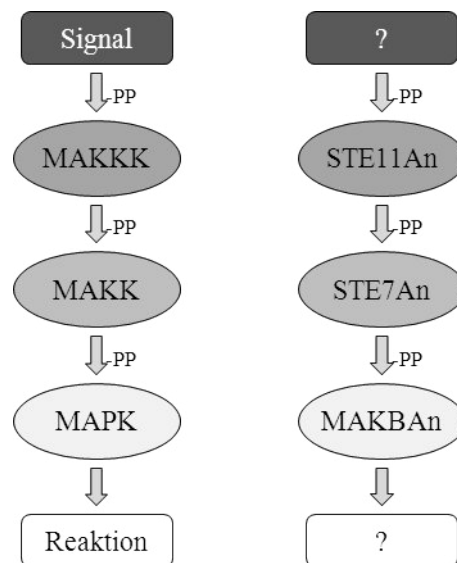


Abb. 1.6: MAK-Signalwege bestehen aus drei übereinander angeordneten Kinasen. Die MAKKK wird bei der Wahrnehmung eines Signals durch Phosphorylierung aktiviert, als Folge aktiviert sie die MAKK, ebenfalls durch Phosphorylierung, welche als letztes die MAK phosphoryliert. Die nun aktive MAK interagiert daraufhin mit weiteren Proteinen, die eine spezifische Zellantwort auslösen. Der linke Bereich der Abbildung stellt eine allgemeine MAK-Kaskade, der rechte stellt beispielhaft die bekannten Komponenten des MAKB-Signalweges aus *A. niger* da.

1.5.2 Aufgaben von mitogen-aktivierten Proteinkinasen in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*

Im Gegensatz zum konservierten Aufbau sind die Reaktionen, die homologe Signalwege in verschiedenen Organismen hervorrufen, z.T. sehr unterschiedlich. Die ersten beschriebenen Kinasen waren ERK1/2 aus Hühnerzellen (Cooper *et al.* 1984). Von größerem Interesse für diese Arbeit sind allerdings die fünf MAK-Signalwege der Bäckerhefe *S. cerevisiae*. Von allen bekannten MAK-Signalwegen gelten die Signalwege der Hefe als am besten charakterisiert und werden daher oft als Paradigma für andere

MAK-Kaskaden verwendet.

Der „Pheromone Response Pathway“ mit der MAP-Kinase Fus3 ist einer der MAK-Signalwege aus *S. cerevisiae*. Der Weg reguliert das durch Peptid-Pheromone gelenkte, zueinander gerichtete Wachstum zweier Hefezellen während der sexuellen Vermehrung. Eine Besonderheit dieses Signalwegs ist, dass bei einem Verlust der MAP-Kinase Fus3 einige Funktionen von der teilweise homologen MAP-Kinase Kss1 übernommen werden können (Elion *et al.* 1991).

Kss1 ist außerdem am „Filamentous Growth Pathway“ beteiligt. Der Signalweg wird bei Nährstofflimitierung aktiviert und bewirkt einen Morphologiewechsel vom apolaren zum filamentösen Wachstum, wodurch es der Hefe ermöglicht wird neue Nährstoffquellen zu erschließen (Gimeno *et al.* 1992).

Ein weiterer Signalweg ist der „High Osmolarity / Glycerol Pathway“ (Hog1). Die Kaskade wird als Reaktion auf hohen osmotischen Stress aktiviert. Sie kann dabei sowohl auf kurzfristig osmotischen Stress durch Aktivierung von Na^+/H^+ Antiporter (Proft und Struhl 2004), als auch auf langfristigen Stress durch die Aktivierung des Glycerin-Metabolismus reagieren (Brewster *et al.* 1993, Nevoigt und Stahl 1997, Albertyn *et al.* 1994).

Des Weiteren besitzt *S. cerevisiae* den „Cell Wall Integrity Pathway“. Die daran beteiligte MAP-Kinase Slt2 (Spm1) ist essentiell für die Regulierung des Wachstums von Hefezellen sowie für die Aufrechterhaltung und Kontrolle einer intakten Zellwand. Fehlt die Kaskade, können sich die Zellen nur unzureichend an verändernde Umweltbedingungen anpassen und es kommt verstärkt zur Zelllyse (Lee *et al.* 1993).

Die fünfte MAK-Kaskade, der „Spore Wall Assembly Pathways“ (Smk1) ist ebenfalls in der Regulierung des Zellwandaufbaus involviert. Im Gegensatz zum vegetativ eingebundenen „Cell Wall Integrity Pathway“ ist er allerdings während der Ascosporenbildung aktiv. Der „Spore Wall Assembly Pathway“ ist sehr wenig erforscht, man kennt nur wenige der mitwirkenden Komponenten. Bekannt ist allerdings, dass er, wie auch der „Filamentous Growth Pathway“, durch Nährstoffmangel beeinflusst wird (Chen und Thorner 2007). Eine Störung des Signalwegs führt zu einer verminderten Vitalität der betroffenen Sporen unter Stressbedingungen (Krisak *et al.* 1994). Interessanterweise verzögern sich das Auftreten und die Art der Defekte in hypomorphen *smk1*-Stämmen mit zunehmender Smk1-Konzentration. Dies deutet an, dass unterschiedliche Stadi-

en des Prozesses unterschiedliche Mindestkonzentrationen an aktivem Smk1 benötigen (Wagner *et al.* 1999).

Eine weitere Kinase in der Bäckerhefe ist Kdx1 (Ykl161c). Für diese Kinase ist bisher weder ein eigener Signalweg beschrieben, noch konnten mögliche Funktionen identifiziert werden. Der Großteil der Informationen beruht daher auf Sequenzanalysen. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass YKL161c in einem Yeast-two-Hybrid Assay mit Rlm1 interagiert, einem Transkriptionsfaktor der auch mit Slt2p in Interaktion tritt (Watanabe *et al.* 1997).

Im Gegensatz zur Hefe wurden für viele Pilze nur drei MAP-Kinase-Signalwege beschrieben, und es konnten auch keine weiteren durch Computeranalysen identifiziert werden. Die quantitative Diskrepanz zu den sechs in *S. cerevisiae* beschriebenen MAP-Kinasen liegt in der Evolution der Hefe begründet. In ihrer Entwicklung kam es zu einer Genom-Duplikation, sodass Gene redundant vorlagen. Viele Gene gingen wieder verloren, da ihr Verlust keinen Selektionsnachteil verursachte, andere konnten frei mutieren da ihre ursprüngliche Funktion weiterhin von ihrer jeweiligen Kopie übernommen wurde (Kellis *et al.* 2004). Auch die teilweise redundanten Funktionen von Fus3 und Kss1 sind durch die Duplikation erklärbar und konnten durch Sequenzabgleich bestätigt werden.

Im Gegensatz zu den Pilzen sind für Säugetiere zwölf MAP-Kinasen beschrieben. Sie werden aufgrund ihrer Sequenz in vier Unterfamilien eingeteilt, welche auch für andere Organismen übernommen wurde. Mit Ausnahme von HOG1 und seinen Orthologen, die der Unterfamilie p38 zugeordnet werden, befinden sich alle MAP-Kinasen von *S. cerevisiae* in der Unterfamilie ERK1 (<http://kinase.com/kinbase>).

1.5.3 Aufgaben und Funktionen von MAKB-orthologen

MAP-Kinasen in Pilzen

Die MAKB-orthologe MAP-Kinase Erk2 aus *Dictyostelium discoideum* wird in Gegenwart von Folsäure aktiviert. Die Amöbe orientiert daraufhin ihr Wachstum in Richtung der Säurequelle und somit in Richtung von Bakterien, der Nahrungsquelle von *D. discoideum*, die die Säure sekretieren (Maeda und Firtel 1997).

Auch im mykoparasitären Pilz *Trichoderma virens* ist die MAKB-orthologe Kinase TmkA am Wachstum beteiligt. $\Delta tmkA$ Stämme weisen eine insgesamt reduzierte

Geschwindigkeit des Hyphenwachstums auf. TmkA ist demnach nicht wie ihr Hefe-Homolog an der Wuchsrichtung, sondern am allgemeinen Wachstumsprozess beteiligt. Außerdem wurde gezeigt, dass TmkA ein lichtabhängiger Repressor für die asexuelle Sporenbildung sowie an der Infizierung von Wirten des Pilzes beteiligt ist (Mukherjee *et al.* 2003).

Insbesondere die Bedeutung der MAKB-orthologen Kinasen als Pathogenitätsfaktoren wurde für viele Pilze beschrieben. Beispielsweise sind $\Delta cek1$ -Mutanten von *Candida albicans* nicht in der Lage, vom apolaren zum invasiven Hyphenwachstum zu wechseln und können daher ihre Wirtszellen nicht mehr effektiv infizieren (Csank *et al.* 1998).

Auch viele Pflanzenpathogene wie *Magnaporthe grisea* oder *Colletotrichum lagenarium* sind nicht in der Lage, ihre Infektionsstrukturen, die Appressorien, auszubilden, wenn die Funktion der Fus3/Kss1 orthologen Kinase fehlt (Xu und Hamer 1996, Takano *et al.* 2000).

In *Neurospora crassa*, einem nicht pathogenen, filamentösen Pilz, ruft die Deletion der orthologen MAKB Kinase MAK-2 einen pleiotropen Phenotyp hervor. Die mutierten Stämme wachsen z.B. deutlich langsamer, sind nicht mehr in der Lage vegetativ zu fusionieren, sind weiblich steril und die Ascosporen sind nicht lebensfähig (Pandey *et al.* 2004).

Im Gegensatz zur MAP-Kinase MAKB aus *A. niger*, die noch nie Gegenstand einer wissenschaftlichen Veröffentlichung war, gibt es bereits mehrere Veröffentlichungen über die MAP-Kinase MpkB aus dem nahe verwandten Ascomyzet *A. nidulans*. Dabei konnte, wie auch für *N. crassa*, eine Beteiligung der Kinase an einer Vielzahl von Prozessen beschrieben werden. Die MAP-Kinase ist sowohl an der asexuellen als auch an der sexuellen Entwicklung beteiligt und die Deletion der Kinase führt zu einer veränderten Konidienmorphologie, einem verlangsamten Hyphenwachstum sowie einer erhöhten Hüllezell Produktion. Die Mutante ist darüber hinaus nicht mehr in der Lage Kleistothezien, die sexuellen Fruchtkörper von *A. nidulans*, zu bilden. Die Abhängigkeit der Kleistothezienbildung von MpkB konnte auch durch die Überexpression der MAP-Kinase gezeigt werden, die zu einer erhöhten Kleistothezienzahl führt (Jun *et al.* 2011). Auch die Regulierung der Produktion von Sekundärmetaboliten in Bezug auf MpkB wurde in *A. nidulans* bereits betrachtet. Dabei zeigte sich, dass die MAP-Kinase in *A. nidulans* an der Regulierung der Expression von Genen unterschiedlicher Biosyn-

thesewege beteiligt ist. Abhängig sind z.B. die Synthesen von Sterigmatocystin, einem Leberkarzinogen, Penicillin, einem Antibiotikum und Terrequinon A, ein Chinon mit antitumoraler Wirkung. Auch die Expression von LaeA wird durch MpkB beeinflusst. Bei LaeA handelt es sich wahrscheinlich um eine Methyltransferase, die die Expression von vielen Sekundärmetabolit-Genclustern reguliert (Atoui *et al.* 2008). Auch an der Wahrnehmung von Licht ist MpkB beteiligt, über die Auswirkungen ist allerdings noch wenig bekannt (Paoletti *et al.* 2007, Bayram *et al.* 2009).

Aus diesen Beispielen, die sich ausschließlich auf das Reich der Pilze beschränken, ist erkennbar, dass trotz eines hohen Konservierungsgrades die MAP-Kinasen ein großes Spektrum an Reaktionen auslösen können und dass von einer homologen Sequenz zweier Kinasen nicht auf deren Aufgabe innerhalb der Zelle geschlossen werden kann.

1.5.4 Lokalisierung von mitogen-aktivierten Proteinkinasen in filamentösen Pilzen

Die Charakterisierung des Phänotyps der Mutation eines bestimmten Gens ermöglicht auf der einen Seite Einblicke, an welchen Zellprozessen das entsprechende Protein beteiligt ist, auf der anderen Seite bleibt die exakte Funktion und die Art und Weise, wie das Protein in diesen Prozessen involviert ist, verborgen. Um hierüber genauere Informationen zu erlangen, hat sich u.a. die Markierung und anschließende Lokalisierung von Proteinen bewährt.

Die MAKB-orthologe MAP-Kinase Fus3 aus *S. cerevisiae* konnte z.B. sowohl im Zellkern, im Zytoplasma und an der Zellmembran nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Kinase in Anwesenheit des Mating-Pheromons sowohl an der Zellmembran, wo sie aktiviert wird, als auch im Zellkern, wo sie ihre Ziele aktiviert, akkumuliert. Nicht aktiviertes Fus3 wird aus dem Zellkern wieder in das Zytoplasma transportiert. Daher ist davon auszugehen, dass die Interaktionen dieser MAP-Kinase mit anderen Proteinen vor allem an der Zellmembran und im Zellkern stattfinden und ihre Hauptfunktion die Signalweiterleitung zwischen diesen beiden Bereichen ist. In Rekrutierungsexperimenten, bei denen die MAP-Kinase durch eine spezielle Aminosäuresequenz fest an der Zellmembran verankert wird, konnte außerdem gezeigt werden, dass diese Rekrutierung allein bereits eine Aktivierung von Fus3 bewirkt (Chen und Thorner 2007, Chen und Thorner 2010).

Die MAP-Kinase Pmk1 aus *Schizosaccharomyces pombe* ist das Ortholog von *S. cerevisiae* Spm1 und somit dem „Cell Wall Integrity Pathway“ zugeordnet (Madrid *et al.* 2006). Pmk1 lokalisiert in *S. pombe* im Zytoplasma und im Zellkern. Im letzteren kann dabei eine permanente Akkumulation der Kinase festgestellt werden. Die erhöhte Konzentration im Zellkern ist dabei unabhängig vom Phosphorylierungsgrad der MAP-Kinase. Durch Photobleaching-Experimente konnte außerdem ein kontinuierlicher Austausch der Pmk1 Kinasen im Zytoplasma mit denen im Zellkern nachgewiesen werden. Interessanterweise führt auch die Aktivierung der MAP-Kinase zu keiner gesteigerten Akkumulation der Kinase im Zellkern. Die Ergebnisse zeigen, dass *S. pombe* kein reguliertes Transportsystem für die Aktivierung der Zielproteine von Pmk1 benötigt, sondern dass auch der zufällige Transport von aktivierten neben nicht aktivierten Pmk1 hierfür ausreichend ist (Sánchez-Mir *et al.* 2012).

Für MpkB, das *A. nidulans* Ortholog von *A. niger* MAKB konnte ebenfalls eine Aktivierung der Kinase an der Zellmembran bei der Initialisierung der sexuellen Entwicklung nachgewiesen werden. Außerdem konnte mit Kollokalisierungsstudien gezeigt werden, dass nicht nur MpkB, sondern die gesamte MAP-Kinase-Kaskade von der Zellmembran zum Kern wandert, MpkB aber als einzige Kinase der Kaskade in den Kern gelangt, um dort die Zielproteine zu aktivieren (Bayram *et al.* 2012).

Die Lokalisierungsmuster orthologer MAP-Kinasen kann eine erstaunliche Vielfalt annehmen. So sind genetisch identische Keimlinge des filamentösen Ascomyzeten *N. crassa* in der Lage, miteinander über kurze Distanzen zu kommunizieren, ihr Wachstum zueinander auszurichten und, wenn sie sich berühren, zu fusionieren, wodurch sie relativ schnell ein großes Netzwerk bilden. Während des Ausrichtens und des gerichteten Wachstums kommt es dabei zu einer wechselseitigen, oszillatorischen Rekrutierung der Fus3-orthologen Kinase MAK-2 an der Spitze der beteiligten Keimlinge. Die Frequenz dieser Akkumulation beträgt sechs bis zehn Minuten, d.h. innerhalb dieser Zeitspanne akkumuliert das Signal an einer Keimlingsspitze, dissoziiert wieder und beginnt mit der Akkumulation an der Spitze des anderen Keimlings. Eine verstärkte Kernlokalisierung der MAP-Kinase wird innerhalb dieses Prozesses zu keinem Zeitpunkt festgestellt und auch in isoliert wachsenden Keimlingen ist nur ein schwaches Kern-, Hyphenspitzen- bzw. zytoplasmatisches Signal der Kinase MAK-2 erkennbar (Fleissner *et al.* 2009, Dettmann *et al.* 2012).

Durch Lokalisierungsstudien konnten auch weitere Informationen über die Aufgaben der MAP-Kinase BcSak1 aus *Botrytis cinerea* gewonnen werden. Für die Kinase konnte eine Aktivierung unter oxidativen, genauso wie unter osmotischen Stressbedingungen gezeigt werden. Die Lokalisierung von BcSak1 offenbarte allerdings im Anschluss, dass die durch oxidativen Stress aktivierte Kinase im Zytoplasma verbleibt und die gleiche Kinase, durch osmotischen Stress aktiviert, dagegen im Kern akkumuliert. Obwohl beide Stimuli die Kinase in gleicher Weise aktivieren, konnte durch die Lokalisierung nachgewiesen werden, dass die Kinase in beiden Prozessen verschiedene Funktionen übernimmt. Da es sich bei *B. cinerea* um eine Pflanzenpathogen handelt, wurde auch die Lokalisierung der Kinase während der Infektion von Bohnenblättern beobachtet. Dabei zeigte sich, dass die MAP-Kinase bereits wenige Stunden vor Beginn der Infektion im Kern zu akkumulieren beginnt, sich das Signal während der Infektion noch verstärkt und nach der Infektion wieder vollständig verschwindet. Die Kinase ist damit nicht nur an der Reaktion auf osmotischen Stress beteiligt, sondern ist auch ein Regulator bei der Infektion von Wirtspflanzen (Heller *et al.* 2012).

1.6 Ziel der Arbeit

Im ersten Teil dieser Arbeit wird untersucht, inwiefern die Morphogenese des Myzels von *A. niger* in Flüssigkultur durch die primäre Sporenagglomeration beeinflusst wird. Grundlage für die Versuche ist das Modell der Pelletbildung von Kelly *et al.* (2006), das einen kausalen Zusammenhang zwischen den ersten Interaktionen ruhender Sporen und der finalen Pelletmorphologie vorhersagt.

Für die Untersuchungen der primären Sporenzusammenlagerung sollen die Oberflächen der Sporen verändert werden, sodass unter identischen Inkubationsbedingungen das Verhalten der veränderten Sporen mit denen der Wildtyp-Sporen verglichen, sowie die Auswirkungen auf die weitere Entwicklung beobachtet werden kann. Die Oberflächenveränderung soll durch die Entfernung von Melanin erfolgen, da dies in *A. niger* einen exklusiven Sporenbestandteil darstellt. Hierzu wird das Gen der Polyketidsynthase ALB1 deletiert. ALB1 katalysiert den ersten Schritt der Melanin-Biosynthese in *A. niger*. Anschließend sollen Inkubationsbedingungen, unter denen ein Vergleich der primären Sporenagglomeration zwischen den Stämmen möglich ist, ermittelt und die Auswirkungen auf die weitere Entwicklung und Produktivität mikroskopisch und mit

Hilfe von Aktivitätsassays dargestellt werden.

Der zweite Teil dieser Arbeit hat das Ziel, den Beitrag der MAP-Kinase MAKB zur Morphogenese und Differenzierung in *A. niger* zu bestimmen.

Wie der erste Teil, hat auch dieser Abschnitt einen biotechnologischen Grundgedanken. Bruno *et al.* (2009) beschrieben in einem Tagungsbeitrag ein depolarisiertes Hyphenwachstum in Flüssigkultur, welches sie in Zusammenhang mit der MAP-Kinase brachten. Da filamentöse Pilze vor allem an Hyphenspitzen sekretieren, könnte diese Morphologie Verbesserungen bei der Produktion und Sekretion von Proteinen und chemischen Verbindungen haben und ist daher für die weitere Optimierung solcher Prozesse interessant.

Im Folgenden sollen daher die Auswirkungen sowohl einer Deletion als auch einer dauerhaften Aktivierung der Kinase auf die Morphologie und Differenzierung unter verschiedenen Inkubationsbedingungen betrachtet werden. Hierfür werden die Gene unterschiedlicher Kinasen zum einen deletiert, in mutierter Form in *A. niger* überexprimiert oder mit GFP fusioniert. Die Auswirkungen sollen anschließend u.a. fluoreszenzmikroskopisch und mit Hilfe von Western Blots dokumentiert werden.

Da die Funktion der MAP-Kinase MAKB in *A. niger* bisher nicht beschrieben ist, sollen des Weiteren die einzelnen Aufgaben der MAP-Kinase während des vegetativen Zellzykluses untersucht werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Stämme und Plasmide

2.1.1 *Aspergillus niger*: Stämme - Plasmide - Wachstum

Stämme

In dieser Arbeit wurden eine Vielzahl von Stämmen verwendet bzw. hergestellt. In Tabelle 2.1 sind die für dieser Arbeit relevanten Stämme aufgeführt.

Tab. 2.1: *Aspergillus niger*-Stämme

Name	Ursprung	Genotyp	Suble.	Labor Nr.
AB1.13	-	<i>pyrG</i> ⁻	Uridin Hyg ^S	A1:01
SKAn1015	-	<i>pyrG</i> ⁺	Hyg ^S	A1:25
$\Delta alb1$ AB	AB1.13	$\Delta alb1::hph$	Uridin Hyg ^R	A1:37, A1:38
$\Delta alb1$ SK	SKAn1015	$\Delta alb1::hph$	Hyg ^R	A2:28, A2:29
$\Delta makb$ AB	AB1.13	$\Delta makb::hph$	Uridin Hyg ^R	A1:10
$\Delta makb$ AB_ <i>makb</i>	$\Delta makb$ AB	P _{<i>makb</i>} - <i>makb</i> -T _{<i>makb</i>} , <i>pyrG</i> ⁺	Hyg ^R	A2:01, A2:02
$\Delta ste7$ AB	AB1.13	$\Delta ste7::pyrG$ ⁺	Hyg ^S	A2:07, A2:08
$\Delta ste7$ AB_ <i>ste7</i>	$\Delta ste7$ AB	P _{<i>ste7</i>} - <i>ste7</i> -T _{<i>ste7</i>} , <i>hph</i>	Hyg ^R	A2:09, A2:10
<i>makb-gfp</i> AB	AB1.13	<i>makb-gfp</i> , <i>pyrG</i> ⁺	Hyg ^S	A2:03, A2:04
P _{<i>pki1</i>} <i>makb-gfp</i> AB	AB1.13	P _{<i>pki1</i>} - <i>makb-gfp</i> -T _{<i>gla</i>} , <i>pyrG</i> ⁺	Hyg ^S	A1:39, A1:40
P _{<i>pki1</i>} <i>gfp</i> AB	AB1.13	P _{<i>pki1</i>} - <i>gfp</i> -T _{<i>gla</i>} , <i>pyrG</i> ⁺	Hyg ^S	A1:18
<i>ste7</i> da AB	AB1.13	<i>ste7</i> S218D,T222D, <i>pyrG</i> ⁺	Hyg ^S	A2:11, A2:27

Wachstumsbedingungen

Es wurden zwei Standard-Kultivierungsmethoden verwendet. Stand die Gewinnung von

Sporen im Vordergrund, wurden *A. niger* Sporen auf festem Medium ausplattiert. Zur Schaffung möglichst konstanter Ausgangsbedingungen für Versuche wurde Minimal-Medium verwendet. Wurden dagegen große Mengen an Sporen benötigt, wurde PDA-Medium eingesetzt. Zur Gewinnung von DNA oder Myzel erfolgte die Inkubation in flüssigen Complete-Medium im Schüttelkolben. Bottom- und Top-Agar Medien wurde ausschließlich zur Transformation verwendet.

Tab. 2.2: *Aspergillus*-Medien

Minimal-Medium (MM)		
20	ml	ASPA+N (50x)
2	ml	MgSO ₄ (500x)
1	ml	Spurenelement Lsg. (1000x)
15	g	Agar (bei Festmedium)
10	ml	ggf. Uridin (100x)
ad dH ₂ O 950 ml		
autoklavieren		
50	ml	Glukose (20x)
1	ml	ggf. Hygromycin (1000x)
Complete-Medium (CM)		
20	ml	ASPA+N (50x)
2	ml	MgSO ₄ (500x)
1	ml	Spurenelement Lsg. (1000x)
1	g	Casaminosäure
5	g	Hefeextrakt
15	g	Agar
10	ml	ggf. Uridin (100x)
ad dH ₂ O 950 ml		
autoklavieren		
50	ml	Glukose (20x)
1	ml	ggf. Hygromycin (1000x)

Kartoffel-Dextrose-Agar (PDA)		
39	g	PDA
2	g	Agar (zusätzlich)
10	ml	ggf. Uridin (100x)
ad dH ₂ O 1 l		
autoklavieren		
Bottom-Agar		
20	ml	ASPA+N (50x)
2	ml	MgSO ₄ (500x)
1	ml	Spurenelement Lsg. (1000x)
218,6	g	Sorbitol
12	g	Agar
10	ml	ggf. Uridin (100x)
ad dH ₂ O 950 ml		
autoklavieren		
50	ml	Glukose (20x)
1	ml	ggf. Hygromycin (1000x)
Top-Agar		
20	ml	ASPA+N (50x)
2	ml	MgSO ₄ (500x)
1	ml	Spurenelement Lsg. (1000x)
218,6	g	Sorbitol
6	g	Agar
10	ml	ggf. Uridin (100x)
ad dH ₂ O 950 ml		
autoklavieren		
50	ml	Glukose (20x)

Plasmide

Alle in dieser Arbeit relevanten Plasmide, die für *A. niger* hergestellt bzw. in den Pilz eingebracht wurden, sind in der folgenden Tabelle dargestellt. Darunter sind auch Konstrukte, die als lineares PCR-Amplifikat in *A. niger* transformiert wurden und zirkulär nur in einem Hefe-Plasmid existieren.

Tab. 2.3: Plasmide

Name	Ursprung	Insert
pUB0038	pARAn37	P _{<i>pki</i>} - <i>makb-gfp</i> -T _{<i>gla</i>} - <i>pyrG</i>
pUB0344	pARAn37	P _{<i>makb</i>} - <i>makb</i> -T _{<i>makb</i>} - <i>pyrG</i>
pUB0339	pUB0276	P _{<i>ste7</i>} - <i>ste7</i> -T _{<i>ste7</i>} - <i>hph</i>
pUB0280a	pARAn37	P _{<i>pki1-ste7</i>} da-T _{<i>gla</i>} - <i>pyrG</i>
<i>ste7</i> -pRS426	pRS426	<i>ste7</i> -5'Flanke - <i>pyrG</i> - <i>ste7</i> -3'Flanke
<i>alb1</i> -pRS426	pRS426	<i>alb1</i> -5'Flanke - <i>hph</i> - <i>alb1</i> -3'Flanke
<i>makb</i> -pRS426	pRS426	<i>makb</i> -5'Flanke - <i>hph</i> - <i>makb</i> -3'Flanke
<i>makb-gfp</i> -pRS426	pRS426	<i>makb-gfp</i> -3'Genbereich - <i>pyrG</i> - <i>makb</i> -3'Flanke

2.1.2 *Saccharomyces cerevisiae*: Stämme - Plasmide - Wachstum

Stämme

Tab. 2.4: *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm

Name	Ursprung	Genotyp
FY834	FGSC9721	his3Δ200, ura3-52, leu2Δ1, lys2Δ202, trp1Δ62, mata α

Wachstumsbedingungen

Die Aufbewahrung des FY834 Stammes erfolgte auf YPD-Agarplatten bei 4°C; die Platten wurden regelmäßig überimpft. Für die Transformation des Stammes wurden Kulturen aus flüssigen YPD-Medium verwendet. Die Selektion auf positive Transformatanten erfolgte auf SC-ura Platten. Die Selektion basiert auf der Komplementation der Uracil-Auxotrophie durch das Plasmid pRS426.

Tab. 2.5: Hefe-Medien

YPD		
10	g	Hefeextrakt
20	g	Pepton
15	g	Agar
ad dH ₂ O 900 ml		
autoklavieren		
100	ml	Glukose (Sl: 1 M)
SC -ura		
26,7	g	„drop out base“ mit Glukose
2	g	„drop out mix“ ohne Uracil
15	g	Agar
ad dH ₂ O 900 ml		
autoklavieren		

Hefe-Plasmide

Tab. 2.6: Verwendete Hefe Plasmide

Name	Genotyp
pRS426	URA3, ampR, ori(pMB1), ori (2 micron)

2.1.3 *Escherichia coli*: Stämme - Wachstum

Der *E. coli*-Stamm XL1-Blue MRF' wurde zur Selektion auf positiv ligierte Plasmide, aber auch für Retransformationen zu deren Vervielfältigung verwendet.

Stämme

Tab. 2.7: *Escherichia coli*-Stamm

Name	Ursprung	Genotyp
XL1-Blue MRF'	Stratagene	$\Delta(mcrA)183$, $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$, <i>endA1</i> , <i>subE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i>

Wachstumsbedingungen

Die Inkubation von *E. coli* erfolgte bei 37°C und 80 UpM in LB-Medium. Für die Selektion auf Transformanten wurde dem Medium Ampicilin zugegeben.

Tab. 2.8: Medien

LB		
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	Trypton
	10 g	NaCl
	ad dH ₂ O 900 ml	
	autoklavieren	
	100 mg/l	Ampicilin

2.2 Material

2.2.1 Chemikalien

Für alle Versuche wurden ausschließlich Chemikalien von kommerziellen Anbietern verwendet. Einige ausgewählte bzw. häufig eingesetzte Chemikalien sind in der Tabelle 2.9 aufgeführt.

Tab. 2.9: Chemikalien

Chemikalie	Lieferant
Agar	Roth
Agarose	Sigma
β -Mercaptoethanol	Merck
EDTA, EGTA	Roth
Glukose Monohydrat	Roth
Glycin	Applichem
Hefeextrakt	BD
HEPES	Roth
Hygromycin	Invitrogen
NaCl	Roth
NaOH	Roth
Natriumacetat	Roth
Natriumfluorid	Merck
Natriumorthovanadat	Sigma
Phenol/Chloroform	Roth
SDS	Roth
Sorbitol	Calbiochem

2.2.2 Puffer und Lösungen

Acetatpuffer: Essigsäure (0,1 M), Natriumacetat (0,1 M), mischen bis sich pH 4,8 einstellt (Verhältnis ca. 1:1).

ASPA + N: KCl (350 mM), KH_2PO_4 (550 mM), NaNO_3 (3,5 M),

Borax-Lösung Natriumtetraborat-Decahydrat (38,137 g) in 1 l dH_2O (entspricht 0,1 M)

Coomassie-Entfärbelösung: Essigsäure (10%), Ethanol (30%), ad 1 l dH_2O

Coomassie-Färbelösung: Coomassie Brilliant Blau G-250 (1g), Essigsäure (10%), Ethanol (50%), ad 1 l destilliertes Wasser

DNA-Extraktionspuffer: TrisHCl (100 mM, pH 7,5), NaCl (1,5 M), EDTA (50 mM), Cetyltrimethylammoniumbromid (2%), vor Gebrauch zufügen: β -Mercaptoethanol (1%)

Denhardt's: BSA (1%), Ficoll 400 (1%), Polyvinylpyrrolidon (1%)

Färbereagenz: o-Dianisidin Dihydrochlorid (25 mg), 96% Ethanol (10 ml)

Glucosereagenz: Peroxidase (3 mg), Glukoseoxidase (10,5 mg), Sörensenpuffer pH 7,4 (90 ml), Färbereagenz (10 ml), klar bis leicht orange, ggf. filtrieren, nur wenige Tge haltbar

Glukose-Stammlösung: Glukose (1 M)

Lösung I: Glukose (50 mM), TrisHCl (25 mM, pH 8,0), EDTA (10 mM) Lagerung bei 4°C

Lösung II: NaOH (200 mM), SDS (1%)

Lösung III: NaOAc (3 M), Eisessig (12%) Lagerung bei 4°C

Lysispuffer (DNA-Extraktion): TrisHCl (50 mM), EDTA (50 mM), SDS (30 g), Wasser (ad 1 l) autoklavieren, vor Gebrauch zufügen: β -Mercaptoethanol (10 $\mu\text{l}/\text{ml}$)

MgSO_4 -Stammlösung: MgSO_4 (1 M).

pNPG-Lösung: p-Nitrophenyl- β -D-Glycopyranoside (1 mg), 0,1 M Acetatpuffer pH 4,8 (1 ml)

Protein-Extraktionspuffer I: HEPES (50 mM, pH 7,5), EDTA (5 mM, pH 8,0), EGTA (2 mM, pH 8,0), NaCl (100 mM), TritonX (1%), Glycerin (10%), Natriumorthovanadat (1 mM), Natriumfluorid (10 mM), Roche complete (1 Tablette), ad 20 ml ddH_2O

Protein-Extraktionspuffer II: Proteinextraktionspuffer I, β -Glyzerol Phosphat (60 mM), p-nitro Phenylphosphat (15 mM), ad 20 ml ddH₂O

(β -Glyzerol Phosphat und Natriumorthovanadat sind Phosphatase Inhibitoren, p-nitro-Phenyl- phosphat ist ein künstliches Phosphatase Substrat)

Protein-Hybridisierungspuffer: siehe 1x TBST

Protein-Ladepuffer (5x): Tris-HCl (12 ml, pH 6,8), SDS (20 ml aus 20% SL), Glycerin (2 ml 100% Lsg.), β -Mercaptoethanol (6 ml), Bromphenolblau (Spatelspitze)

Protein-Laufpuffer: Tris (15,2 g), Glycin (72,0 g), SDS (5,0 g), ad 1 l dH₂O

SEVAG: Chloroform:Isoamylalkohol (24:1)

Sörensen-Puffer pH 5,0 bzw. 7,4: Kaliumdihydrogenphosphat (50 mM), Dinatriumhydrogenphosphat (50 mM), mischen bis sich pH 5,0 bzw. 7,4 einstellt

Southern-Hybridisierungslösung: SSPE (5x), Denhardt's (5x), SDS (0,5%), Lachs-sperma DNA/Applichem (10 μ g/ml), Dextransulfat (7,5%)

Spurenelement-Lösung (1000x): EDTA (10 g), ZnSO₄ x 7H₂O (4,4 g), MnCl₂ x 4H₂O (1,01 g), CuSO₄ x 5H₂O (0,315 g), FeSO₄ x H₂O (1 g), CoCl₂ x 6H₂O (0,32 g), CaCl₂ x 2H₂O (1,47 g), (NH₄)₆Mo₇O₂₄ x 4H₂O (0,22 g), pH 5,5 mit KOH, ad 1 l dH₂O

20x SSPE: NaCl (3 M), NaH₂PO₄ (200 mM), EDTA (20 mM), NaOH (10 M), mit HCl auf pH 7,4 einstellen, autoklavieren

2x-SSPE-Waschpuffer: 20x SSPE (50 ml), 10% SDS (5 ml), H₂O (445 ml)

1x-SSPE-Waschpuffer: 20x SSPE (25 ml), 10% SDS (5 ml), H₂O (470 ml)

Sukroslösung: Sucrose (1,65 M) in Sörensenpuffer (pH 5,4),

50x TAE: Tris (242 g), Eisessig (57,1 ml), 0,5 M EDTA pH 8,8 (100 ml), ad 1 l H₂O

10x TBS: Tris HCl (200 mM), NaCl (1,5 M), mit HCl auf pH 7,5 einstellen

1x TBST: 10x TBS (50 ml), Tween20 (0,1-0,5%), H₂O (450 ml)

TE-Puffer TrisHCl pH 8,0 (10 mM), EDTA (0,1 mM)

Uridin-Stammlösung: Uridin (1 M)

Western Transferpuffer: Tris (3g), Glycin (14,4g), Methanol (20%) , ad 1 l dH₂O

2.2.3 Primer

Tab. 2.10: Primer

Name	Sequenz	Lab-Nr
alb1-RT-F	TTGGAGACCAGACCAGCGACATC	364
alb1-RT-R	TGATTCCAGAAACCAACGC	365
eYFP R	TGCAGCAAATGCCTCCTCAAGGG	262
makb-Komp-For	TTCTTCACGCGTCTTCTTCTTCTTCTTCTCCTCC	674
makb-Komp-Rev	TTCTTCCATATGCCCACCGCTCCCTGACCAC	675
mak-b-Yeast-For	GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGCGG ATCCAGGAACTGATGG	426
mak-b-gfp-Rev	CCCTTGCTCACCATCCGCATAATCTCCTCG	427
gfp-mak-b-For	GAGGAGATTATGCGGATGGTGAGCAAGGGC	428
gfp-pyrG-Rev	CTCGAGGAAGTTGCTTACTTGTACAGCTCG	429
pyrG-gfp-For	CGAGCTGTACAAGTAAGCAACTTCCTCGAG	430
pyrG-mak-b-3'-Rev	CATCGACTCGTGAAGCCTTCAAAGTCCAATC	431
mak-b-3'-pyrG-For	GAGTTGGACTTTGAAGCTTCACGAGTCGATG	432
mak-b-3'-Yeast-Rev	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCCTC CACAAACCTCCC	433
mak-b-Test-For	TGCAGCAAATGCCTCCTCAAGGG	456
PMF2 (Isao)	GGACACGCTGAACTTGTGGC	20
pks-Seq-2-For 400	CACTGGTGTTCTGAGCTGC	283
PKS-test-f	TGCAGGATACTGAACAAGCCGTGA	184
pyrG-ste7-5'-For	CGGTGCGCAACATCGCTCgcaacttcctc	589

Name	Sequenz	Lab-Nr
pyrG-ste7-3'-Rev	AAATAGGGCCGGAAGTtcaaagtccaactc	590
pyrG-Test-Rev	gctggaagtgggatgg	594
Seq PkiA (F)	GCCAGCTCTCAACCCGCGGGGAACCGACCG	551
Seq TglaA (R)	CACTACTATTATGCACACCCACTAC	552
ste7-5'-Yeast-For	gtaacgccagggttttccagtcacgacgGGTCATGTGATGTGCTGG	587
ste7-5'-pyrG-Rev	gcgttctcgaggaagttgcGAGCGATGTTGCGCACC	588
ste7-3'-pyrG-For	aaaagagttggactttgaACTTCCGGCCCTATTTCC	591
ste7-3'-Yeast-Rev	agcggataacaatttcacacaggaaacagcGGATCCGATTTCCTCGTTTCC	592
ste7-Test-For	ACGCTTGTGGCGCGGG	593
ste7-Kompl-For	ATGATGGGTACCGCTGGAGCTGTGGCTGGAG	658
ste7-Kompl-Rev	ATGATGAAGCTTAGGGGGAATGATGAACGGG	659
Ste7-Yeast-For	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTCTAGATGGCCGATCAATTC	421
Ste7-S218-T222D-Rev	GACGAAGTCATCAGCGATGTCGTTGACTGTCTC	422
Ste7-S218-T222D-For	CAACGACATCGCTGATGACTTCGTCGGCAC	423
Ste7-Yeast-Rev	GCGGATAACAATTTTCACACAGGAAACAGCGAA TTCCTAGACGGCACCCGTC	424
Ste7-Seq-Primer	GTACCTGTACGAAGCTCATCG	425
tpm-RT-F	ATGGATAAGATCAAGGAGGTG	202
tpm-RT-R	AACATTGCTGATGGAGACC	203

2.3 Quantifizierungsmethoden

2.3.1 Quantifizierung der Sporulationsrate

Die Bestimmung der Sporulation erfolgte angepasst an die jeweiligen Anforderungen der Experimente.

Bestimmung der Sporulation von radiär wachsenden Kolonien.

Die radiäre Ausbreitung einer Pilzkolonie entspricht am ehesten dem natürlichen Wachstum von *Aspergillus niger*. Dem entsprechend erfolgte die primäre Charakterisierung der verschiedenen Stämme auf Grundlage dieser Wuchsform, woraus sich für die Quantifizierung der Sporulation drei Probleme ergaben. Zum einen ist das radiäre Wachstum heterogen, das heißt, dass sich verschiedene Bereiche der Kolonie in unterschiedlichen Entwicklungsphasen befinden. Dies wird besonders bei dem Vergleich des weißlichen Randbereichs mit der Mitte der Kolonie deutlich. Es wäre daher ein systematischer Fehler, einen kleinen Teil der Kolonie auszuwählen und anhand dessen Analyse, auf die Sporulation der gesamten Kolonie zu schließen. Daher wurde für die Quantifizierung jeweils die gesamte Kolonie ausgeschnitten und in 5 ml bidestilliertem Wasser überführt. Die Quantifizierung der Sporenzahl erfolgt nach gründlichem Vortexen mittels Thoma-Zählkammer. Die Einheit zu diesem Zeitpunkt, nach Berücksichtigung aller Umrechnungsfaktoren, ist Sporen/Kolonie.

Aus dieser Einheit ergibt sich das zweite Problem, da der Term „Kolonie“ nicht ausreichend definiert ist. Um eine Vergleichbarkeit zu erreichen, musste eine einheitliche, definierte Basis verwendet werden. Hierfür bietet sich das Flächenmaß: „cm²“ an. Bei jeder Probenentnahme wurde daher aus dem Koloniedurchmesser die Fläche der jeweiligen Kolonie ermittelt und die Sporulation im Anschluss in Sporen/cm² angegeben.

Das dritte Problem war nicht so offensichtlich erkennbar wie die ersten beiden. Es ergab sich aus der zeitlichen Betrachtung der Sporulation und wurde erst unter Berücksichtigung nicht nur absoluter, sondern auch temporärer Sporulationsveränderungen sichtbar. Um diesem Problem Rechnung zu tragen, wurde die Sporulation zu unterschiedlichen Zeitpunkten quantifiziert.

Bestimmung der Sporulation von synchronisiertem Myzel.

Synchronisiertes Myzel bietet den Vorteil, dass sich alle Bereiche einer Kolonie im gleichen Entwicklungsstadium befinden. Dies ist für viele Versuche essentiell, z.B. der

Untersuchung der entwicklungsabhängigen Expression von Proteinen. Für die Bestimmung der Sporulation bietet die homogene, synchrone Entwicklung des Pilzes den Vorteil, dass alle Bereiche eine identische Sporenzahl aufweisen. Die Analyse eines vergleichsweise kleinen Bereich ermöglicht daher eine repräsentative Aussage über die Gesamtsporenzahl der Probe. Für die Bestimmung wurde mit einem scharfen Stecheisen von 5 mm Durchmesser eine Probe aus dem Myzel entnommen und in 1250 ml filtrierten, bidestilliertem Wasser überführt. Die entstandene Sporensuspensionen wurden im Anschluss mittels FACS-Analyse quantifiziert. Nach Berücksichtigung der verwendeten Fläche und Verdünnung erfolgte die Angabe in Sporen/cm².

2.3.2 Quantifizierung der Keimungsrate

Zur Bestimmung der Keimungsrate wurden frisch geerntete Sporen von vier bzw. sechs Tage alten Kulturen auf Minimal-Medium ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für sechs bzw. acht Stunden. Von den Proben wurden zufällige Mikroskopaufnahmen bei 40- und 100-facher Vergrößerung angefertigt. Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte mit Hilfe der Cell Counter Funktion von ImageJ. (ImageJ: Plugins - Analyze - Cell Counter; Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Dabei wurden alle Sporen, die vollständig in der Aufnahme erfasst waren und bei denen eine Keimung erkennbar war, als gekeimt gezählt. Alle Sporen die vollständig im Bild erfasst wurden und eindeutig nicht gekeimt waren, wurden als nicht gekeimt gezählt. Teilweise erfasste Sporen, Sporen bei denen eine Keimung nicht eindeutige erkennbar war, sowie Agglomerate, bei denen Sporen vollständig von anderen Sporen umschlossen waren und bei denen die inneren Sporen keine Möglichkeit zur Keimung hatten, wurden vernachlässigt.

2.3.3 Quantifizierung der Hyphenwachstumsgeschwindigkeit

Die Bestimmung der Wachstumsrate erfolgte mit radiär wachsenden Kolonien. Für den Versuch wurde auf festem Minimal-Medium mittig ein Sporentropfen aufgebracht. Durch dessen Mittelpunkt wurden mehrere Linien gezogen, entlang derer das Wachstum bestimmt wurde. Nach frühestens 24 h bzw. nach eindeutiger Ausprägung einer Wachstumsfront, wurde diese als Nulllinie markiert. Das Wachstum wurde für die nächsten fünf Tage fortlaufend alle 24 h dokumentiert, sodass der Auswertung jeder

Messung mindestens 10 Messwerte zugrunde liegen.

2.3.4 Der Sporenaggregations-Assay

Die Fläche von sich in Flüssigkultur zusammenlagernden Sporen wurde mit Hilfe des Sporenaggregations-Assays bestimmt. Für die Analyse wurden 50 ml Minimalmedium auf pH 2,0 bzw. 3,5 eingestellt und mit 2×10^6 Sporen pro ml beimpft. Die Sporen wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn für 1 min mit Ultraschall behandelt, um bereits existierende Zusammenlagerungen aufzulösen. Die Inkubation erfolgte in 250 ml Erlenmeyer Kolben bei 80 UpM und 37°C. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde mit abgeschnittenen 1000 µl Spitzen Proben aus den Schüttelkulturen entnommen. Für die Analyse wurden einige µl davon auf Objektträger übertragen und bei 40x Vergrößerung 15-20 Zufallsaufnahmen je Probe angefertigt. Aus den Bildern ergaben sich bei starker Aggregation 110-150, bei schwacher Aggregation 350-600 Messpunkte (Zusammenlagerungen bzw. einzelne Sporen. Für die Analyse der Aufnahmen wurde das Programm ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) verwendet. Die Aufnahmen wurden dabei in binary 8-Bit Bilder konvertiert und die verschiedenen Partikelgrößen mit der Particle Analysing Function von ImageJ bestimmt. Um das Hintergrundrauschen der Messungen zu reduzieren, wurden nur Partikel beachtet, die mindestens eine halbe Sporengröße aufwiesen. Als Ergebnis gibt ImageJ eine Tabelle mit fortlaufenden Partikelnummern und den dazugehörigen Flächen, sowie ein Bild mit den umrandeten Partikeln und der entsprechenden Partikelnummer aus (Abb. 2.1). Alle Bilder wurden abschließend nochmals manuell überprüft und Messwerte, die nicht auf Sporen beruhten, entfernt. .

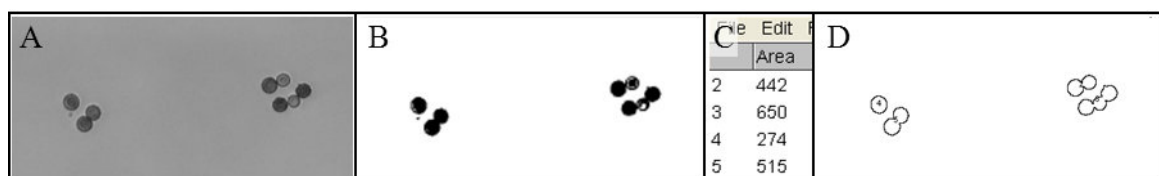


Abb. 2.1: Analyse der Sporenagglomeration mit Hilfe von ImageJ. Alle Bilder wurden für die automatische Quantifizierung zu 8 Bit Schwarz-Weiß Bilder umgewandelt (B). Anschließend erfolgte die Quantifizierung aller zusammenhängender Flächen. Als Ergebnis wurde zum einen eine Tabelle mit einer numerischen Auflistung aller Flächen und den dazugehörigen Flächeninhalt (C), sowie ein dazugehöriges Übersichtsbild ausgegeben (D). Mit diesen Daten war eine nachträgliche Zuordnung jedes Messwerts zu einem bestimmten Partikel möglich.

2.3.5 Quantifizierung der Sporenaggregation mit einer Partikelmesssonde

Bei der LasenTec Sonde handelt es sich um eine optisch arbeitende Sonde zur Quantifizierung der Größe von Partikeln. Der Messkopf der länglichen Sonde befindet sich am äußersten Ende des Stabes und ist durch eine Glasscheibe leicht erkennbar. Das Messverfahren der Sonde beruht auf der Aussendung eines Laserstrahls über einen rotierenden Spiegel und der anschließenden Detektion der durch Partikel verursachten Reflexionen.

Da die Sonde eine gewisse Größe besitzt, wurde der Versuch in 2,2 l Rührreaktoren durchgeführt. Zur Vermeidung von Messfehlern durch Schwebstoffe im verwendeten Minimal-Medium wurde vor jedem Versuch das Medium 24 h zirkulierend durch einen Sterilfilter gepumpt, bis darin keinerlei Partikel mehr messbar waren. Die Sporenernnte erfolgte unmittelbar vor dem Versuch. Die Sporen wurden dabei zum einen durch Filtration durch „Chesse Cloth“ von Myzelresten getrennt, zum anderen wurden sie durch eine einminütige Ultraschall Behandlung vereinzelt. Alle diese Reinigungs- und Separierungsschritte mußten vor Versuchsbeginn durchgeführt werden, da die Sonde nicht zwischen Sporen und sonstigen Schwebstoffen unterscheiden kann.

Der Reaktor wurde für den Versuch nach Einstellung des pH-Werts mit 10^7 Sporen pro ml beimpft. Die Messung startete unmittelbar vor Zugabe der Sporen, wobei die ersten Minuten nicht auswertbar waren, da die inhomogene Verteilung zu sehr großen Messschwankungen führte. Die Rührgeschwindigkeit des Reaktors betrug 80 UpM, der pH-Wert wurde permanent kontrolliert und konstant gehalten. Die Daten jeder Messung wurden exportiert und mit einem Tabellenkalkulationsprogramm ausgewertet.

2.3.6 Benässbarkeits- und Hydrophobizitäts-Assay

Der Hydrophobizitätstest dient zur Quantifizierung der hydrophoben Eigenschaften von Sporen. Für die Untersuchung wurde eine modifizierte Version des Zwei-Phasen-Separations-Test von Rosenberg *et al.* (1980) verwendet. Hierfür wurden Sporen von vier Tage alten Kulturen mit einer 0,9%igen NaCl Lösung frisch geerntet, filtriert und mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurde 1,5 ml Sporensuspension aus 10^7 Sporen pro ml in bidestilliertem Wasser mit 500 µl Hexadekan überschichtet und

die Proben zwei Minuten gevortext. Nach 10 Minuten trennten sich die wässrige und die organische Phasen wieder, sodass die wässrige Phase in Küvetten überführt werden konnte. Die Messung der optischen Dichte der Proben erfolgte bei einer Wellenlänge von 400 nm. Als Referenz dienten identisch behandelte Sporensuspensionen, zu denen kein Hexadekan gegeben wurde.

Für den Vergleich der Benässbarkeit der einzelnen Stämme wurde ein 50 µl Wassertropfen auf eine vollständig sporulierte, vier Tage alte Kultur gegeben. Der Tropfen wurden fotografiert und ihr Höhe zu Breite Verhältnis ermittelt.

2.4 Beeinflussung der Morphologie

2.4.1 Synchronisation der Pilzmyzel Entwicklung

Ein Großteil der Versuche hatte das Ziel, die Aufgaben und Funktionen von MAKB in den verschiedenen Entwicklungsstufen aufzuklären. Die Synchronisation der Entwicklung von Pilzmyzels ist dabei von grundlegender Bedeutung. Diese Notwendigkeit wird deutlich, wenn man sich vor Augen führt, dass Sporen unterschiedliche Zeitspannen bis zum Auskeimen benötigen. Des Weiteren können bereits gekeimte Sporen andere, in der Umgebung befindliche Sporen am Keimen hindern, um sich selbst einen Wachstumsvorteil zu verschaffen. Durch diese Einflüsse entwickelt sich ein Pilzmyzel von Anfang an sehr inhomogen (s.Abb. 2.2 B), was eine Untersuchung der Expression und Phosphorylierung der Kinase zu bestimmten Zeitpunkten und somit die Aufklärung einer möglichen Funktion unmöglich macht.

Stine und Clark (1967) sowie Siegel *et al.* (1968) beobachteten, dass filamentöse Pilze submers in Flüssigkultur keimen und ein aufwärts gerichtetes Hyphenwachstum aufweisen, dabei aber nicht differenzieren. Die Differenzierung erfolgt erst nach Erreichen der Oberfläche und ständigem Sauerstoffkontakt. Diese Beobachtung kann zur Synchronisierung von Kulturen verwendet werden. Nach einer Veröffentlichung von Axelrod *et al.*(1973) ist es für eine Synchronisation von *A. nidulans* ideal, die Sporen zuerst für 20h in Flüssigkultur keimen und wachsen zu lassen, das Myzel im Anschluss abzufiltrieren und auf mit Medium getränkte Membranen auszuplattieren. Dabei wurde bereits vier Stunden nach dem Umsetzen eine homogene Konidiophorbildung in allen Plattenbereichen beobachtet. Eine Verlängerung der submersen Inkubation hat,

solange die Hyphen die Medium-Oberfläche nicht erreichen, keinen Einfluss auf die spätere Konidophorbildung, eine Verkürzung der submersen Kultivierung hat dagegen eine asynchrone Entwicklung des Myzels nach dem Umbetten zur Folge.

Die von Axelrot *et al.* beschriebene Methode erwies sich als nicht durchführbar, da es unmöglich war, in Flüssigkultur entwickeltes Myzel homogen auf feste Oberflächen auszubringen (s. Abb. 2.2 C). Eine Folge dieser Inhomogenität ist die Ausbildung von Bereichen hoher und niedriger Myzelkonzentration, die sich in ihrer weiteren Entwicklung voneinander unterscheiden. Als Lösung erwies sich eine Abwandlung der von Axelrot *et al.* beschriebenen Methode. Sie basiert auf dem Übersichten von Festmedium mit Flüssigmedium und Sporen, sodass sich nach dem Keimen der Sporen zuerst submerse, nicht differenzierte Hyphen bilden. Die Induktion der Differenzierung erfolgte durch das Absaugen des bedeckenden Flüssigmediums. Durch diese Modifizierung wurde das problematische Umschichten vermieden und das Myzel entwickelte sich absolut synchron (Abb. 2.2 A, D).

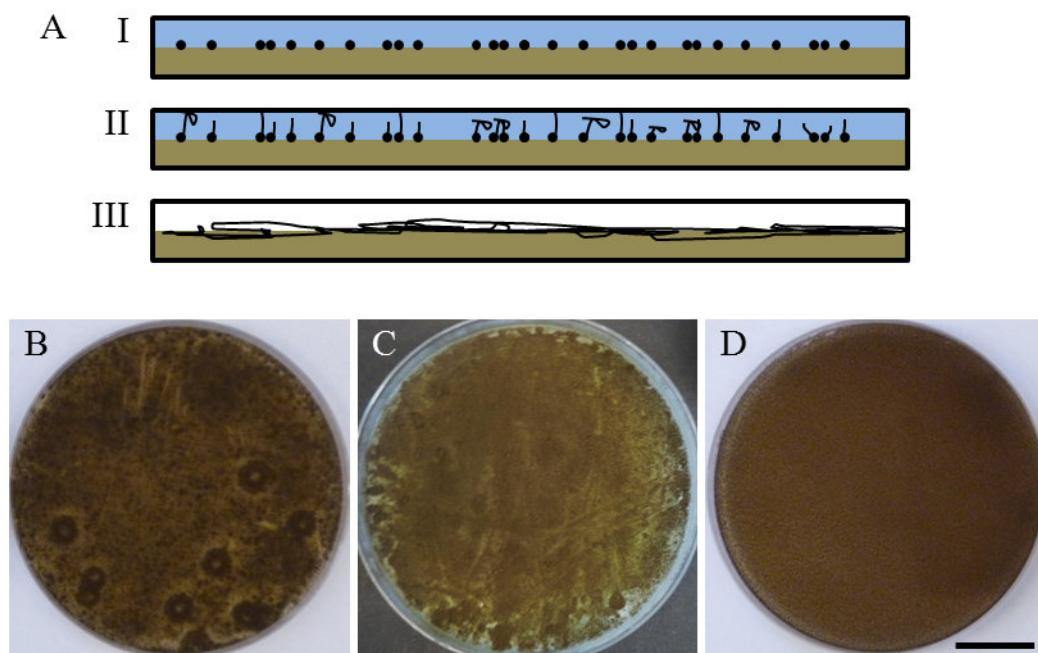


Abb. 2.2: Auswirkungen verschiedener Ausplattierungsverfahren auf die Myzelentwicklung und Sporulation von filamentösen Pilzen. In *A. niger* wird eine synchrone Entwicklung durch submerse Inkubation der Sporen auf festem Medium erreicht (A, I) Nach Keimung wachsen die Hyphen Richtung Mediumoberfläche (A, II). Die Induktion der Differenzierung erfolgt durch Absaugen des Flüssigmediums nach 13 Stunden (A, III). Der Vergleich der Myzeldifferenzierung unterschiedlich beimpfter Kulturen. A: Sporen wurden mit Glasperlen ausplattiert, B: synchronisiertes Myzel nach Axelrod *et al.*. C: synchronisiertes Myzel nach submerser Inkubation wie in A beschrieben.

2.4.2 Biofilmbildung

Bei der Biofilmbildung handelt es sich um einen zweistufigen Prozess. Für dessen Analyse wurden 15 ml flüssiges Minimal-Medium in Petrischalen aus Polystyrol gegeben und mit 10^6 Sporen pro ml beimpft. Die Kulturen wurden anschließend für eine definierte Zeitspanne bewegungslos bei 37°C inkubiert, sodass sich die Sporen auf dem Boden absetzen, sich an ihm anheften und ggf. auch keimen konnten. Im Anschluss an diese ruhende Inkubation wurden die Platten auf einen sich in der horizontalen Ebene bewegenden Schüttler überführt und bei definierten Geschwindigkeiten weiterhin bei 37°C geschüttelt. Durch die Bewegung des Mediums wurden schwach gebundene Sporen abgewaschen und bewegten sich frei im Medium. Dagegen blieben fest adhärierte Sporen am Boden haften. Abgelöste Sporen verblieben im Medium um zu untersuchen, ob frei schwimmende Keimlinge oder junge Hyphen die Auswirkungen der losgelösten Sporen während der Biofilmbildung kompensieren können. Durch die Schwenkbewegung wurden die Hyphen der adhärierten Sporen immer wieder an den Boden der Platte gedrückt, sodass sich mit der Zeit ein Biofilm entwickeln konnte. Gleichzeitig wurde durch die permanente Überspülung des Myzels die Differenzierung und somit die Konidienbildung unterdrückt.

Für eine quantitative Auswertung der Sporenanheftung wurden Aufnahmen vom Boden der Petrischalen mit gut und schlecht haftenden Sporen angefertigt und die prozentuale Flächenbedeckung des Bodens mit Hilfe der Partikel Analyse Funktion der ImageJ Software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) ermittelt (Kap. 2.3.4).

2.5 Analyse der Morphologie und Fluoreszenz-mikroskopie

2.5.1 Mikroskopie

Probenvorbereitung

Mikroskopiert wurden Sporen, Keimlinge, Myzel und Konidiophore sowohl von Fest- als auch aus Flüssigmedium. Als Standardmedium wurde dabei immer Minimal-Medium verwendet. Für die Mikroskopie von Proben aus Flüssigmedium wurden diese auf Objektträger übertragen, mit einem Deckglas bedeckt und, bei Myzelproben, ggf. ge-

quetscht. Bei Proben von Festmedium wurde ein Agarblock aus dem Medium geschnitten, auf den Objektträger gelegt und mit einem Deckglas bedeckt. Wenn notwendig, wurde vor dem Bedecken Wasser auf die Probe pipettiert, sodass sich während dem Mikroskopieren immer ein Wasserfilm um diese herum befand.

Mikroskopie

Für die Mikroskopie wurde ein Zeiss Axiophot 2 Mikroskop sowie Objektive mit 5-, 40-, 63- und 100-facher Vergrößerung verwendet. Als Lichtquelle für die Normaski-Mikroskopie wurde eine Halogen-, für die Fluoreszenz-Mikroskopie eine Quecksilber-Kurzbogenlampe eingesetzt. Bilder wurden mit einer PCO Pixelfly Kamera aufgenommen, die von einer in der Arbeitsgruppe Schnabel entwickelten Software gesteuert wurde. Die Software wurde von Christian Hennig an die jeweiligen Erfordernisse angepasst. Die schwarz-weißen Fluoreszenzbilder wurden nach der Aufnahme mit Hilfe der ImageJ-Software entsprechend ihrer natürlichen Farbgebung eingefärbt.

2.5.2 Rasterelektronenmikroskopie

Die Dokumentation morphologischer Änderungen erfolgte mit Hilfe von Rasterelektronenmikroskopaufnahmen (Maerker *et al.* 2005). Als Proben wurden Sporen und kleine Myzelfragmente von sechs Tage alte Kolonien mit einem Wattestäbchen auf die Klebeschicht von Pins übertragen. Anschließend wurden die Proben in einem Vakuum mit Goldpartikeln überzogen und für die Analyse in das Elektronenmikroskop verbracht.

2.5.3 Herstellung von Pellet- und Biofilmschnitten

Für die Dokumentation der Pelletstruktur wurden Querschnitte aus fixierten Pellets nach Lin *et al.* (2010) angefertigt. Für die Untersuchungen wurden Pellets aus flüssigem Medium von Schüttelkulturen direkt in Einbettmedium (NEG-50) überführt. Die Proben wurden für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur in dem viskosen Einbettmedium inkubiert, sodass das flüssige Minimal-Medium der Kultivierung vollständig ersetzt wurde. Anschließend wurden die Pellets einzeln in kleine Vertiefungen überführt, diese mit NEG-50 aufgefüllt und bei -20°C eingefroren. Nachdem das Einbettmedium sich vollständig verfestigt hat, wurde der resultierende Block mit einem Gefriermikrotom in 80 µm dünne Scheiben geschnitten. Die entstandenen Pelletquerschnitte wurden mikroskopisch dokumentiert.

Das Fixieren von Myzel erwies sich bei der Anfertigung von Querschnitten von Biofilmen als ungeeignete Methode. Zum einen kam es zu erheblichen Stauchungen und Verformungen bei der Vorbereitung des Biofilm-Myzels, zum anderen sollte auch die Lebensfähigkeit der unterschiedlichen Bereiche der Biofilme durch GFP-Expression überprüft werden, wofür ein Einfrieren des Myzels nicht in Frage kam. Biofilm Querschnitte wurden daher direkt in der Inkubationsschale unter Medium durch tangentielle Schnitte mit einem Skalpell angefertigt. Die Querschnitte wurden auf Objektträger überführt und Bereiche mit verwendbarer Schichtdicke und intakter Struktur mikroskopisch analysiert.

2.6 DNA-Isolierung

2.6.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Die Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* erfolgte aus über Nacht Flüssigkulturen. Diese wurden zuvor mit jeweils einer *E. coli* Kolonie von Festmedium in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin angeimpft und bei 37°C geschüttelt. 1,5 ml der Kultur wurden in Reaktionsgefäße überführt, die Bakterien für 30 Sekunden abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Bakterien wurden in 100 µl Lösung I (Kap. 2.2.2) resuspendiert und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Lösung II zugegeben, der Ansatz vorsichtig durchmischt und die Proben erneut kurz auf Eis inkubiert bevor 150 µl Lösung III zugegeben wurden. Nach erneutem Vermischen und inkubieren auf Eis wurden die Proben zum Abtrennen der Zelltrümer bei 16.000 UpM und 14°C für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml 100% Ethanol überschichtet. Nach kurzem Vermischen wurde die ausfallende DNA bei 13.000 UpM für 15 Minuten pelletiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und nach einminütiger Trocknung im 80°C Ofen in 50 µl TE mit RNase resuspendiert. Plasmid DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.6.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Saccharomyces cerevisiae*

Alle Kolonien einer Hefetransformation wurden mit sterilem Wasser abgewaschen, die Zellen in ein Schraubdeckel-Reaktionsgefäß überführt, zentrifugiert und der Überstand

verworfen. Für den Zellaufschluss wurden die Zellen in 300 µl Lösung I (siehe 2.2.2) resuspendiert, Glaskugeln (Durchmesser ca. 0,5 mm) hinzugefügt und für 3x 10 Sekunden bei einer Beschleunigung von 6,5 m/s² in einem „Bead Beater“ aufgeschlossen. Im Anschluss wurden zuerst 600 µl Lösung II zugegeben, kurz geschwenkt und dann 450 µl Lösung III zugegeben. Nach nochmaligem kurzen Schwenken wurden die Proben für 15 Minuten bei 13.000 UpM zentrifugiert und der Überstand auf 1 bis 2 neue Reaktionsgefäße verteilt. Die Plasmide wurden mit 2 Volumen 100% Ethanol gefällt, 5 min pelletiert und mit 70% Ethanol gewaschen. Nach der Trocknung wurde das Pellet in 100 µl sterilem Wasser gelöst. Die Isolierung der Kassette aus dem Plasmid erfolgte anschließend durch PCR mit den äußeren Primern, die auch für die Amplifizierung der flankierenden Fragmente verwendet wurden (siehe 2.8.1).

2.6.3 Isolierung von genomischer DNA aus *Aspergillus niger*

Die Isolierung von genomischer DNA aus *A. niger* erfolgte aus Pellets von ein bis zwei Tage alten Flüssigkulturen. Das Myzel wurde nach der Kultivierung durch Vakuumfiltration vom Medium getrennt, mit destilliertem Wasser gewaschen, in Stickstoff eingefroren und durch Mörsern aufgeschlossen. Im Anschluss wurde das gefrorene Myzelpulver in Schraubdeckel-Reaktionsgefäße überführt, Glasbeats und 750 µl Lysispuffer zugegeben, nochmals bei für 3x 30 Sekunden bei einer Beschleunigung von 6,5 m/s² im „Bead Beater“ aufgeschlossen und eine Stunde bei 65°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 700 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben, der Ansatz gevortext und 10 Minuten bei 13.000 UpM zentrifugiert. 600 µl der oberen wässrigen Phase wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 700 µl SEVAG das restliche Phenol herausgewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren für fünf Minuten wurden 500-550 µl der oberen Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 20 µl 3 M Natriumacetat und 1 Volumen Isopropanol präzipitiert. Zum Pelletieren der DNA wurden die Proben fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 100 µl TE mit RNase aufgenommen. Eventuelle Unreinheiten wurden durch weitere Wasch- bzw. Zentrifugationsschritte entfernt. Die genomische DNA wurde bei 4°C gelagert.

2.7 DNA-Transformation

2.7.1 DNA-Transformation in *Escherichia coli*

Zur Vervielfältigung aber auch zur Aufreinigung von Plasmiden nach Ligationen wurden diese in *E. coli* Zellen transformiert. 2 µl Ligationsansatz oder 1 µl reines Plasmid wurden für die Transformation zu 50 µl elektrokompenten *E. coli* Zellen gegeben. Der gesamte Ansatz wurde vorsichtig in eine 2 mm Küvette pipettiert und mit einer Spannung 2,3 kV, einem Widerstand von 200 Ohm und einer Feldstärke von 25 µF elektroporiert. Sofort nach der Elektroporation wurde 1 ml LB-Medium zu den Zellen gegeben, diese mit dem Medium zusammen in ein Glasröhrchen überführt und für eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden 100 µl bzw. 900 µl auf LB Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Entstandene Kolonien wurden in flüssigem LB Medium mit Ampicillin inkubiert und die Plasmide extrahiert (Kap. 2.6.1).

2.7.2 DNA-Transformation in *Saccharomyces cerevisiae*

Die Transformation von *S. cerevisiae* wurde in dieser Arbeit ausschließlich zur Zusammensetzung von einzelnen DNA-Fragmenten durch die rekombinante Hefeklonierung verwendet. Als erstes wurden hierfür über Nacht Vorkulturen aus 5 ml YPD Medium und *S. cerevisiae* FY834 Zellen angeimpft. Am Folgetag wurde eine 50 ml YPD-Flüssigmedium Hauptkultur mit 1 ml der Vorkultur beimpft. Die Start OD wurde bei 600 nm gemessen und die Kultur bei 37°C geschüttelt bis sich die OD vervierfacht hatte. Die Zellen wurden 5 min bei 2000 UpM abzentrifugiert, das Pellet in 25 ml sterilem Wasser resuspendiert, erneut abzentrifugiert und in 1 ml 100 mM LiOAc resuspendiert. Das Gemisch wurde nun in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, erneut abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 400 µl LiOAc resuspendiert. Für jede Transformation wurden 50 µl der Zellen in ein Reaktionsgefäß vorgelegt, erneut abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde ein Transformationsmix bestehend aus 240 µl 50% PEG 3350 (w/v), 36 µl 1 M LiOAc, 50 µl „Carrier“-DNA sowie Wasser (34 µl minus dem Volumen aller DNA-Fragmente) zugegeben. Als letztes wurde dem Transformationsansatz ein Gemisch der einzelnen DNA-Fragmente, inklusive des linearisierten Hefevektors pRS426, zugefügt. Das Reak-

tionsgefäß wurde gevortext bis sich das Pellet vollständig gelöst hatte und für 30 min bei 30°C inkubiert, gefolgt von einer Inkubation von 30 min bei 42°C. Bevor die Zellen ausplattiert wurden, wurden sie abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen mit sterilem Wasser gewaschen. Nach erneutem Pelletieren wurde der Überstand bis auf 100-200 µl eingengt, die Zellen vorsichtig resuspendiert und auf SC-ura Platten ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 30°C, wobei sich nach zwei bis drei Tagen gut sichtbare Kolonien bildeten.

2.7.3 DNA-Transformation in *Aspergillus niger*

Lineare und zirkuläre DNA-Fragmente wurden durch Protoplastentransformation in *A. niger* eingebracht (Punt und van den Hondel 1992). Für die Transformation wurde Myzel aus 24 bis 48 Stunden alten Flüssigkulturen über Büchnertrichter vakuumfiltriert und mit SMC-Puffer (Kap. 2.2.2) gewaschen, sodass das Kulturmedium vollständig entfernt wurde. Das Myzel wurde in ein 50 ml Falcon mit 10 ml frisch angesetzten Lysispuffer überführt und für ein bis zwei Stunden vorsichtig schwenkend bei 37°C inkubiert. Der Lysispuffer enthält zellwandabbauende Enzyme und fördert somit die Protoplastenbildung. Diese wurde regelmäßig kontrolliert und die Inkubation ggf. weiter fortgesetzt. Waren 20-30 Protoplasten im Mikroskopie-Sichtfeld bei 20x Vergrößerung vorhanden, wurde die Reaktion durch Zugabe von STC-Puffer und vorsichtigem, luftblasenfreien Auf und Abpipettieren mit einer Glaspipette abgestoppt. Die Protoplasten wurden durch Filtration in ein neues Falcon vom verbleibenden Myzel abgetrennt und 10 Minuten bei 2000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Protoplasten in 1 ml STC-Puffer aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen dreimal bei 4000 UpM in der Tischzentrifuge für fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in frischem STC-Puffer durch Rühren und Pipettieren mit einer abgeschnittenen Spitze resuspendiert. Nach dem letzten Reinigungsschritt wurden die Zellen in 260 µl STC-Puffer aufgenommen. 200 µl der Protoplasten wurden mit 20 µl DNA und 50 µl PEG-Puffer versetzt, vorsichtig verrührt und nochmals 1 ml PEG-Puffer zugegeben und verrührt. Die restlichen Protoplasten wurden, abgesehen von der DNA-Zugabe, identisch behandelt und dienten als Kontaminationskontrolle. Alle Ansätze inkubieren maximal fünf Minuten bevor 2 ml STC-Puffer und 25 ml Top-Agar (maximal 45°C) zugegeben wurden. Der Ansatz

wurde sofort auf 4 leere Petrischalen verteilt und nach dem Erstarren mit Bottom-Agar überschichtet. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für mehrere Tage, wobei Kolonien vor dem Einsetzen der Sporulation in Schrägagarröhrchen vereinzelt wurden. Abschließend fand eine Einzelsporisolation, sowie die Kontrolle der Transformanten durch PCR und Southern Blot statt.

2.8 DNA-Modifizierung

2.8.1 DNA-Amplifizierung durch PCR

Für die Amplifizierung definierter DNA Fragmente wurde die Polymerase Ketten Reaktionen (PCR) mit spezifischen Primern (s. Tab. 2.10) durchgeführt (Saiki *et al.* 1988). Dabei wurden zur Gewinnung möglichst fehlerfreier Amplifikate das Phusion DNA Polymerase Kit (NEB / Fermentas) und für Kontroll-PCRs das LA Taq Polymerase Kit (TAKARA) verwendet.

Ein typischer PCR-Reaktionsansatz bestand aus folgenden Komponenten:

1 µl	DNA-Lösung (10 - 100 ng)
je 2,5 µl	Forward- und Reversprimer (10 mM)
1 µl	dNTP (je 0,4 mM)
10 µl	Reaktionspuffer (10x)
0,5 µl	Polymerase
ad 50 µl	bidestilliertes Wasser

Die Tabelle 2.11 stellt die grundlegende Struktur eines PCR-Programms dar.

2.8.2 Agarosegelelektrophorese

Die DNA Auftrennung erfolgt nach Sambrook et al. (1989) durch Anlegen eines elektrischen Feldes an Agarosegelen (0,8% + 0,5 µg/mL Ethidiumbromid) in 1x TAE-Puffer. Zur Probenbeladung wurden die Proben mit 10x DNA-Ladepuffer versetzt. Dieser enthält 30% Glycerol zum Beschweren der DNA sowie Bromphenolblau, Xylen-cyanol oder OrangeG zur Verfolgung der Lauffront. Als Größenstandard diente die 1 kb Leiter (Fermentas).

Tab. 2.11: PCR-Bedingungen zur DNA-Amplifizierung

Schritt	Dauer	Temperatur	Zyklen
erste Aufschmelzung	5 min	94 - 98°C	1
Denaturierung	30 sek	94 - 98°C	
Primer Anlagerung	30 sek	Primerabhängig, zw. 55 und 70°C	35
Elongation	1 min/kb	72°C	
Finale Elongation	5 min	72°C	1
Reaktionsende	-	4°C	1

2.8.3 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurden mit Hilfe eines gewerblich erhältlichen Kits nach Herstellerangaben extrahiert (HiYield PCR clean up/Gel Extraktions Kit, SLG, Gaithersburg, Deutschland).

2.8.4 RT-PCR

RNA wurde aus Sporen, aus Myzel aus Flüssigkultur und, eher ineffizient, aus Myzel von Festmedium isoliert. Sporen wurden mit 0,9% NaCl Lösung geerntet, sofort in ein Reaktionsgefäß überführt, abzentrifugiert, der Überstand verworfen und in flüssigem Stickstoff gefroren. Myzel aus Flüssigkultur wurde vakuumfiltriert und Myzel von Festmedium mit einem Spatel abgeschabt, in Folie verpackt und ebenfalls in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der Aufschluss erfolgte in flüssigem Stickstoff durch Mörsern, das entstandene Pulver wurde in Aliquots zu je 100 mg aufgeteilt. Die RNA Isolierung erfolgte nach einem Standardprotokoll (Sambrook und Russell 2001). Die Erststrang-Synthese wurde mit dem Fermentas RevertAid H Minus cDNA Synthesis Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Die entstandene cDNA wurde ausschließlich zur qualitativen Kontrolle der Genexpression verwendet.

2.8.5 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme gehören zur Gruppe der Endonukleasen, einer Untergruppe der Nukleasen, die doppelsträngige DNA sequenzabhängig schneiden und dabei sowohl

glatte als auch überhängende Enden erzeugen können. Für einen Verdau wurden je nach Anforderung und Konzentration des Enzyms zwischen 5 (0,5 µl) und 100 Units (10 µl) eingesetzt. Jeder Verdau inkubierte mindestens zwei Stunden bei 37°C. Zum Vermeiden von Rezirkularisierungen wurden beim Einfach- und „Blunt-End“-Verdauen im Vorfeld der Ligation die 5'Phosphatreste durch alkalische Phosphatase entfernt (0,1 U/µg DNA, 30 Minuten bei 37°C). Die Phosphatase wurde abschließend durch Inkubation bei 85°C für 15 Minuten inaktiviert. Im Anschluss an Restriktionsverdau bzw. Dephosphorylierungen wurde die DNA durch Agarosegelelektrophorese gereinigt. Im Folgenden ist ein typischer Restriktionsverdau dargestellt:

je 0,5 µl	Restriktionsenzym
2 µl	Reaktionspuffer (10x)
1-15 µl	DNA (1 µg)
ad 20 µl	bidestilliertes Wasser

2.8.6 Ligation

Die Ligation stellt im Wesentlichen die Umkehrung der Restriktion dar. Die T4-Ligase katalysiert dabei die Bildung neuer Phosphodiesterbrücken zwischen dem 5'-Phosphat- und dem 3'-OH-Enden zweier freier, doppelsträngiger DNA-Enden. Im Gegensatz zur Restriktion ist die Ligation ATP und Mg^{2+} abhängig. Bei der Ligation lagert sich zuerst die Ligase an ein freies Ende und verbindet im Anschluss dies mit einem passenden, unbesetzten Gegenstück. Aus diesem Grund ist dies eine der wenigen Reaktionen, wo eine zu hohe Menge an Enzym die Reaktion inhibieren kann. Ein Ligationsansatz besteht zumeist aus linearisiertem Vektor und dem Insert, idealerweise im Verhältnis 1:4 bis 1:10 (Sambrook *et al.* 1989). Die Inkubationszeit beträgt mindestens 30 Minuten bei 37°C, sie kann aber auch für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C durchgeführt werden. Ein typischer Ansatz ist im folgenden dargestellt:

2.8.7 Rekombinante Hefeklonierung und „Gene Replacement“ durch homologe Rekombination

Die Herstellung von Ausschaltmutanten erfolgte durch Gene Replacement. Bei dieser Methode wird das Zielgen durch einen Selektionsmarker mittels homologer Rekombi-

1 µl	linearer Vektor (10-20 ng)
5-10 µl	Insert (40-200 ng)
2 µl	Ligase Puffer (10x)
0,5 µl	T4 DNA-Ligase
ad 20 µl	bidestilliertes Wasser

nation ersetzt, wofür eine Ausschaltkassette benötigt wird. Diese wurde durch rekombinante Hefeklonierung (Yeast Recombinational Cloning, YRC) aus einzelnen DNA-Fragmenten erstellt. Beide Methoden können dabei nicht nur für den Knock out von Genen angewendet werden, sondern auch zur Herstellung von künstlichen Genkombinationen aus einzelnen Fragmenten in beliebiger Reihenfolge sowie deren homologe oder heterologe Integration im Zielorganismus (Collopy *et al.* 2010).

Rekombinante Hefeklonierung

YRC beruht auf der Fähigkeit des Hefestamms FY834 sehr kurze, nur 30-40 bp lange, homologe DNA-Überhänge zu erkennen und zusammenzufügen (Ma *et al.* 1987, Colot *et al.* 2006). Dadurch ist es möglich, DNA-Fragmente, die mittels PCR mit speziellen Primer erzeugt wurden, in eine gewünschte Reihenfolge zu bringen. Die Primer besitzen hierfür nicht bindende 5' Überhänge, die komplementär zu dem Bereich des anschließenden Fragments sind (Abb. 2.3). Nach der Transformation der einzelnen DNA-Fragmente und des linearen Hefevektors pRS426 in die Hefe FY834 wurden diese durch homologe Rekombination zu einem zirkulären Plasmid zusammengebaut (Abb. 2.3 B). Nach der Isolierung der Plasmid-DNA aus den positiven Transformanten konnte die zusammengefügte Kassette entweder durch PCR mit den äußersten Primern, oder, falls in den Primern vorgesehen, durch Restriktionsschnittstellen isoliert werden.

„Gene Replacement“ in *Aspergillus niger*

„Gene Replacement“ beruht, ebenso wie das YRC der Hefe, auf der Fähigkeit von *A. niger* homologe Gensequenzen zu rekombinieren. Hierfür benötigt *A. niger* mit ca. 1 kb Länge allerdings deutlich größere homologe Bereiche als die Hefe. Durch die Rekombination wird alles was sich im Genom zwischen den flankierenden Bereichen befindet, durch die Gensequenz die sich auf der Austausch-kassette befindet, ersetzt

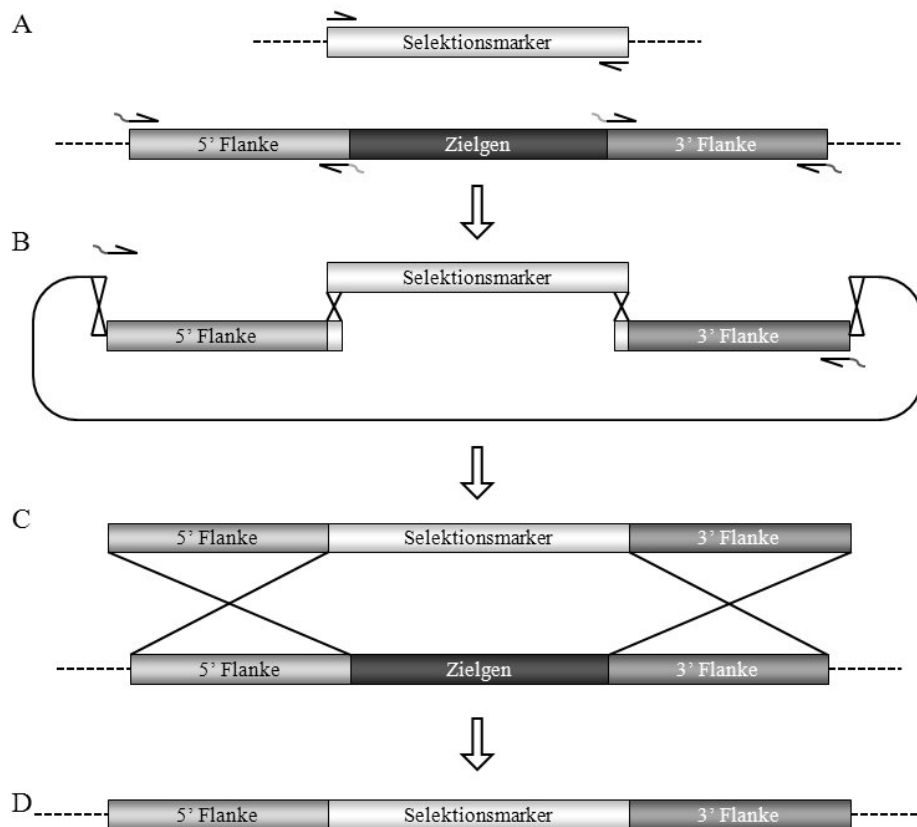


Abb. 2.3: Herstellung von Ausschaltkassette mittels homologer Rekombination und „Gene Replacement“ A: Amplifizierung einzelner DNA Fragmente mit homologen Überhängen zu den entsprechenden Nachbarfragmenten. B: Zusammenbau der einzelnen Fragmente zu einer durchgehenden Sequenz. C: „Gene Replacement“ durch homologe Rekombination im Zielorganismus. D: Ergebnis der Gendeletion.

(Abb. 2.3 C, D). Da es bei dieser Methode auch zu heterologen Rekombinationen oder partiellen Integrationen kommen kann, müssen die Transformanten abschließend durch PCR und Southern Blot kontrolliert werden.

2.9 Biochemische Analysen

2.9.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird zum Auftrennen von denaturierten Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichtes verwendet (Laemmli 1970). Die Proteine wandern dabei entlang eines elektrischen Feldes durch das Polyacrylamid-Gel, das als „molekulares Sieb“ fungiert und dessen „Maschen“ durch die eingesetzte Acrylamid Konzentration dem gesuchten Proteinen angepasst werden kann.

Proteinextraktion und Probenvorbereitung

Proteinextrakte von *A. niger* wurden aus Schüttelkulturen und aus Myzel von Festmedium gewonnen. Das Inokulum für Flüssigkulturen bestand aus 10^7 Sporen pro ml. Die Inkubation erfolgt in luftdurchlässig verschlossenen 250 ml Kolben ohne Schikane, gefüllt mit 50 ml Medium, geschüttelt bei 80 UpM und 37°C. Durch Vakuumfiltration und dreimaligem Waschen mit destilliertem Wasser wurde das Myzel vom Medium getrennt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proteingewinnung von Festkulturen erfolgte mit Hilfe synchronisierter Kulturen (Kap. 2.4.1). Bis zur 16-Stunden-Probe wurden die Kulturen für die Ernte mit Flüssigmedium überschichtet, anschließend mit einem Spatel abgeschabt, in ein Falcon überführt, abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Myzel in flüssigem Stickstoff eingefroren. Ab der 16-Stunden-Probe war das Myzel mechanisch direkt vom Medium ablösbar. Es wurde ebenfalls in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

Der Aufschluss von Proben kleiner Volumina erfolgte mit Glasperlen und Proteinextraktionspuffer (Kap. 2.2.2) im „Bead Beater“ in drei Zyklen à 30 Sekunden mit jeweils 15 Sekunden Unterbrechung und einer Beschleunigung von $6,5 \text{ m/s}^2$ bei 4°C. Das Puffer-Probenverhältnis beträgt 200-500 mg Probenmaterial je 1 ml Extraktionspuffer. Proben großer Volumina wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert, aliquotiert und anschließend wie Proben kleiner Volumina behandelt. Nach dem Aufschluss im Puffer wurden die Proben bei 4°C und $13000 \times g$ zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 5x Proteinladepuffer (Kap. 2.2.2) versetzt, für 5 Minuten bei 100°C denaturiert und abschließend auf Eis wieder abgekühlt. Die denaturierten Proteinproben konnten nun direkt auf ein Gel aufgetragen oder für spätere Versuche bei -80°C gelagert werden. Da Teile der Proben einen schwarzen, vom Pilz sekretierten Farbstoff enthielten, erübrigte sich eine Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford. Eine Konzentrationsabschätzung erfolgte stattdessen im Anschluss an die Polyacrylamid-Gelelektrophorese durch einen Proteinbandenvergleich nach der Coomassie-Färbung.

Herstellung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Für die Elektrophorese von Proteinen wurden SDS-Polyacrylamid-Gele verwendet. Die-

se bestehen aus einem Trenn- und einem darüber geschichteten Sammelgel, mit den Taschen für die Beladung des Gels. Die Gele wurden maximal drei Tage vor ihren Einsatz angefertigt, folgend ist die Zusammensetzung eines typischerweise verwendeten Trenngeles mit 12% Acrylamid dargestellt:

5,6 ml	Wasser
6,8 ml	Acrylamid
4,25 ml	Tris (1,5 M, pH 8,8)
170 µl	SDS (10%)
36 µl	EDTA (0,5 M, pH 8,0)
63 µl	APS (10%)
25 µl	TEMED

Nach dem Gießen der Gele wurden diese zum Vermeiden von Luftblasen mit Isopropanol überschichtet und wurden mindestens 30 Minuten ausgehärtet. Vor dem Überschichten des Trenngels mit dem Sammelgel musste das Isopropanol, durch mehrmaligem Spülen mit Wasser, vollständig entfernt werden. Die Zusammensetzung des Sammelgels war unabhängig von der Konzentration des Trenngels immer identisch:

2,8 ml	Wasser
640 µl	Acrylamid
1 ml	Tris (0,5 M, pH 6,8)
40 µl	SDS (10%)
20 µl	EDTA (0,5 M, pH 8,0)
25 µl	APS (10%)
8 µl	TEMED

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte in Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad) Laufkammern mit 1x Laupuffer bei 100 V für zwei bis drei Stunden. Es konnten maximal 30 µl je Tasche aufgetragen werden. Als Größenstandard wurde die Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas) verwendet.

Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Die Coomassie-Färbung diente zur Darstellung aller Proteine auf einen Gel. Sie basiert auf dem anionische Farbstoff Coomassie Brilliant Blue. Die Gele wurden für die

Färbung in die Färbelösung gelegt, vorsichtig für wenige Sekunden in der Mikrowelle erwärmt, ohne die Lösung zum Kochen zu bringen und anschließend für 30 Minuten unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurde die Färbelösung abgegossen und das Gel mit Entfärbelösung inkubiert. Diese wurde mehrmals gewechselt, bis ein gutes Kontrastverhältnis zwischen Banden und Hintergrund erreicht war.

Western Blot

Beim Western Blot wurden die während der Elektrophorese aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine proteinbindende Membran (Hybond-P, GE Healthcare) übertragen. Hierzu musste die Membran zunächst durch Methanol aktiviert und im Transferpuffer (Kap. 2.2.2) äquilibriert werden. Der Transfer erfolgte bei 20-30 V über Nacht bei 4°C in einer Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad).

Immunologischer Nachweis von Proteinen

Bei der immunologischen Detektion von Proteinen lagern sich Antikörper ausschließlich an für sie spezifische Strukturen. Dadurch ist die Detektion einzelner Proteine in einem Gemisch von Proteinen möglich. Nach dem Blotten sind die Proteine auf der Membran für die Antikörper zugänglich. Da es dabei auch zu unspezifischen Bindungen kommen kann, müssen entsprechende Bindungsstellen auf der Membran zunächst durch Inkubation in 5 - 10 ml Blockierungslösung (Kap. 2.2.2) gesättigt werden. Die Inkubationszeiten aller Schritte sind antikörperspezifisch und wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Im Anschluss wurde der primäre Antikörper zu der Blockierungslösung gegeben. Dieser ist für das gesuchte Protein spezifisch. Nach der Inkubation wurde der Antikörper abgegossen, die Membran mit Protein-Hybridisierungspuffer gewaschen und der sekundäre Antikörper in einer definierten Menge Hybridisierungspuffer zur Membran gegeben. Der sekundäre Antikörper erkennt den primären und bindet an diesen. An ihm selbst ist die Horseradish Peroxidase (HRP) gekoppelt, die nach Zugabe von ECL-Lösung chemoluminesziert. Die Emission wurde auf Röntgenfilmen nachgewiesen und entsprach in Lage und Stärke dem vom primären Antikörper detektierten Protein. Exakte Quantifizierungen konnten aber immer nur im Verhältnis zu Referenzproteinen angegeben werden.

2.9.2 Southern Blot

Ausschaltmutanten wurden zusätzlich zur PCR basierten Kontrolle der homologen Integration auf heterologe Integrationen der Ausschaltkassette getestet. Dies geschah mittels Southern Blot-Analyse in Anlehnung an ein von Sambrook *et al.* veröffentlichte Protokoll (Southern 1975, Sambrook *et al.* 1989). Für die Analyse wurde genomische DNA (10-30 µg in 200 µl) mit Hilfe eines Restriktionsenzym (6 µl) über Nacht bei 37°C verdaut. Am folgenden Tag wurde der gesamte Ansatz zusätzlich nochmals mit 3 µl Restriktionsenzym nachverdaut und das Ergebnis mit einem Testgel kontrolliert. Der gesamte Ansatz wurde anschließend mit 20 µl 3 M NaOAc (pH 8,0) und 1 ml Ethanol (100%) für 2 h bei -20°C gefällt. Im Anschluss an die Fällung wurde die DNA bei 16.000 UpM (15 min) pelletiert, der Überstand vorsichtig verworfen und die Probe mit 70% Ethanol gewaschen. Nach kurzem Trocknen in der Vakuumzentrifuge wurde die Probe in 30 µl H₂O aufgenommen, zum vollständigen Lösen für 5 min auf 65°C erhitzt, mit Ladepuffer (enthält nur Bromphenolblau als Farbstoff) versetzt, auf einem 1,2%igem Agarosegel ohne Ethidiumbromid aufgetragen und über Nacht bei 20 V aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurde das Gel im ca. 100 ml Laufpuffer mit 20 µl Ethidiumbromid 10 min gefärbt, anschließend nochmals 5 min mit Laufpuffer entfärbt und ein UV-Kontrollbild mit Lineal angefertigt. Zur Vorbereitung des Blottes wurde die aufgetrennte DNA mit 0,25 M HCl depuriniert, bis eine Gelb-Färbung der Bromphenolblau-Bande erkennbar war. Anschließend wurde die DNA in 0,4 M NaOH denaturiert, bis sich die gelbe Bande wieder blau färbte. Die Übertragung der DNA auf eine Nylonmembran (Hybond XL, GE Healthcare) erfolgte mittels Kapillarblot über Nacht. Vor der Hybridisierung der geblotteten DNA mit Hilfe von α -CTP markierten Sonden wurde die Membran in 20 ml Hybridisierungslösung (siehe 2.2.2) 2 h bei 65°C geblockt. Kurz vor Ablauf der 2 h wird die Sonde 10 min lang aufgeköcht, kurz auf Eis abgekühlt, abzentrifugiert und nach Abschluss der Vorhybridisierung, zur Hybridisierungslösung gegeben. Die Inkubation erfolgte in einem Rolleninkubator über Nacht bei 65°C. Nachdem die Sonde abgegossen wurde, wurde die Membran zuerst mit 2x SSPE Puffer für 5 min und dann mit vorgewärmten 1x SSPE Puffer für 15 min gewaschen. Die Detektion der Signale erfolgte durch Röntgenfilme, die 2 bis 72 h auf die zwischen Frischhaltefolie eingeschweißte Membran gelegt wurden.

2.9.3 Analyse der Sukraseaktivität

Die Sukraseaktivität wurde von dem Stamm SKAn1015 bzw. seinen Abkömmlingen, wie bereits beschrieben (Driouch *et al.* 2010), bestimmt. Die Analyse erfolgte in mehreren Schritten, die Quantifizierung basierte auf der Dianisidin-Farbreaktion, bei der der annähernd farblose Ausgangsstoff in ein rotbräunliches Oxidationsprodukt umgewandelt wird.

Die Bestimmung der Sukraseaktivität erfolgte sowohl vom Überstand als auch biomasseassoziiert vom Myzel. Für die Analyse der biomasseassoziierten Aktivität wurde die Biomasse eines bestimmten Volumens der Versuchssprobe durch Vakuumfiltration vom Medium getrennt und die Feuchtmasse bestimmt. 1/5 bis 1/10 der Feuchtmasse wurde in flüssigem Stickstoff gefroren, durch Mörsern aufgeschlossen und in einem definierten Volumen Sörensenpuffer aufgenommen (Kap. 2.2.2). Das Volumen richtete sich dabei nach der zu erwartenden Aktivität und musste ggf. angepasst werden. Der Rest der Biomasse wird zur Bestimmung der Biotrockenmasse verwendet.

Die Analyse der Enzymaktivität im Überstand erfolgte direkt mit filtrierten Proben aus dem Inkubationsmedium.

Für die Analyse wurden zu 20 µl Probe 200 µl Sukroslösung (Kap. 2.2.2) gegeben und für exakt 20 min bei 40°C inkubiert. Während dieser Zeitspanne spaltet die Sukrase der Probe die Sukrose in Glukose und Fruktose. Die Reaktion wurde durch 10 Minuten Erhitzen auf 95°C gestoppt, die Proben im Anschluss an das Abstoppen auf Eis gekühlt und abzentrifugiert.

Als Blindwert diente zum einen ein identischer Ansatz mit 20 µl Wasser anstelle der Probelösung, zum anderen die denaturierte Probelösung selbst.

Die Wasserprobe wurde als Kontaminationskontrolle sowie zur Bestimmung des Eigenzerfalls der Sukrase verwendet, sodass dieser bei der Auswertung berücksichtigt werden konnte.

Die denaturierte Blindprobe diente zur Bestimmung der Eigenabsorption der Proben, sowie zum Ausschluß möglicher chemischer Verbindungen, die unabhängig von der Sukrase, die Sukrose spalten könnten und somit falsche Ergebnisse liefern würden. Für die Denaturierung wurden 20 µl Probenvolumen in ein Reaktionsgefäß vorgelegt, bei 95°C denaturiert, auf Eis gekühlt, abzentrifugiert und ab diesem Schritt identisch wie die eigentlichen Meßproben behandelt.

Im Anschluss an die Spaltung der Sukrose wurde die entstandene Glukose quantifiziert. Dafür wurden jeweils 2 μ l des ersten Ansatzes (Mehrfachbestimmung) in Reaktionsgefäße vorgelegt und 200 μ l Glukosereagenz (Kap. 2.2.2) hinzugefügt. Die darin befindliche Glukoseoxidase oxidierte dabei die Glukose und bildet Wasserstoffperoxid, das im Anschluss zusammen mit der Peroxidase o-Dianisidin in eine bräunliche Substanz oxidiert. Da die Reaktion sich nicht stoppen lässt, wurde die Zugabe der Glukosereagenz zu den Reaktionsgefäßen entweder zeitversetzt oder der gesamte Versuch in Mikrotiterplatten mit Mehrkanalpipetten durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte im Anschluss bei 450 nm.

Die Reaktionsgeschwindigkeit hängt im geringen Maße von der jeweils frisch angesetzten Glukosereagenz ab. Daher sollte jedesmal ein Glukosestandard mitgeführt werden. Ein linearer Verlauf der Eichgeraden zeigte sich dabei bei Konzentrationen zwischen 2,5 und 50 mM Glukose.

2.9.4 Analyse der Glucoamylaseaktivität

Die Glucoamylaseaktivität wurde von den Stämmen AB1.13 und SKAn1015 sowie deren Abkömmlingen bestimmt. Die eigentliche Aufgabe von Amylasen besteht in der Spaltung von Mehrfach- zu Einfachzucker. Aus diesem Grund sind Glucoamylasen auch in der Lage, die p-Nitrophenyl-Gruppe von p-Nitrophenyl- β -D-glucuronide (pN-PG) abzuspalten. Die dadurch freiwerdende Phenyl-Gruppe wird durch Zugabe von Natriumborat zum gelben p-Nitrophenol umgewandelt (Withers *et al.* 1998).

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte sowohl vom Überstand als auch von der Biomasse.

Für die Analyse der biomasseassoziierten Aktivität wurde die Biomasse eines bestimmten Volumens der Versuchsprobe durch Vakuumfiltration von Medium getrennt und die Feuchtmasse bestimmt. 1/5 bis 1/10 der Feuchtmasse wurde in 10 ml Acetatpuffer (Kap. 2.2.2) aufgenommen und durch 10 Minuten Mörsern in einer Mörsermühle aufgeschlossen. Der Rest der Biomasse wird zur Bestimmung der Biotrockenmasse verwendet. Im Anschluss an den Aufschluss wurde die gesamte homogenisierte Lösung in ein Falcon überführt, abzentrifugiert, 1 ml des Überstandes in ein neues Falcon gegeben und mit Acetatpuffer auf 10 ml aufgefüllt. Diese 1:10 verdünnte Lösung diente als Probe für die biomasseassoziierte Analyse der Enzymaktivität. Je nach Aktivität

musste die Verdünnung entsprechend angepasst werden.

Für die Analyse der Enzymaktivität im Überstand wurden Proben direkt aus dem Inkubationsmedium verwendet.

Alle Proben, die der Biomasse als auch die des Überstandes wurden bis zur Analyse bei 4°C gelagert, die Analyse erfolgt maximal eine Woche nach Probennahme.

Für die Quantifizierung der Glucoamylaseaktivität wurden zu 500 µl pNPG-Lösung 250 µl Probenlösung gegeben und für 20 Minuten bei 60°C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 750 µl Borax-Lösung (Kap. 2.2.2) sowie sofortigem Überführen der Ansätze auf Eis. Als Kontrollen diente zum einem Wasser, das anstelle der Probenlösung zu dem Ansatz gegeben wurde, zum anderen wurde für jede Probe ein eigener Blindwert angefertigt. Hierzu wurde die Borax-Lösung vor Zugabe der Probe zu der pNPG-Lösung hinzugefügt Anschließend wurde die Blindprobe wie die Messprobe behandelt. Die Ansätze wurden bei 400 nm vermessen. Die Auswertung erfolgt mit einer Eichgerade.

2.9.5 Eichgerade zur Umrechnung der Glucoamylaseaktivität

Für die Umrechnung der Absorption in eine Aktivität ist eine Eichgerade notwendig, die zunächst die umgesetzte Stoffmenge ausgibt. Zur Erstellung dieser Eichgerade wurde eine Verdünnungsreihe bekannter Konzentrationen hergestellt. Die Verdünnungsreihen wurden mit hochkonzentrierter Glucoamylaselösung versetzt, sodass während der Inkubationszeit von einer Stunde das gesamte pNPG umgesetzt wurde. Nach vollständiger Umsetzung wurde die OD₄₀₀ der Proben gemessen und aus den gewonnenen Daten eine Eichgerade sowie deren Funktion erstellt (Abb. 2.4). Es ist somit möglich, jeder gemessenen OD₄₀₀ eine Stoffmenge zuzuordnen. Aus diesen Daten lässt sich im Folgenden unter Berücksichtigung von Verdünnungsfaktoren und der Inkubationszeit die Aktivität in Units berechnen, die anschließend noch auf entsprechende Volumen (U/ml) oder Biotrockenmassen (U/mg) bezogen werden kann.

2.9.6 Bestimmung der Glukosekonzentration im Medium

Die Bestimmung der Glukosekonzentration im Medium erfolgte mit Hilfe der Dianisidin-Farbreaktion (Driouch *et al.* 2010). Da in den Versuchen die verwendeten Glukosekonzentrationen zwischen 12,5 mM und 3,2 M schwankten, eine Messung aber nur

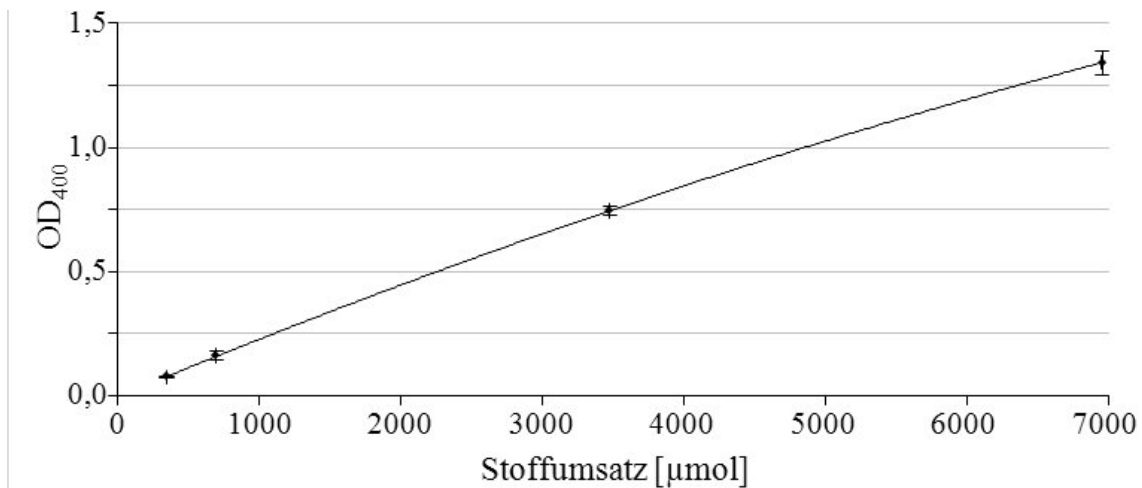


Abb. 2.4: GAM-Eichgerade.

im Bereich von 1 bis 50 mM möglich ist, wurden die Proben entsprechend verdünnt analysiert.

Die Durchführung erfolgte analog der Glukosebestimmung während der Analyse der Sukraseaktivität. Es wurden dabei ausschließlich Proben aus dem Überstand von Medien verwendet. Zur besseren Handhabung der Proben wurde das Untersuchungsvolumen von 2 auf 7 μ l und das Volumen der Reaktions-Reagenz von 200 auf 700 μ l erhöht. Für die Umrechnung der Messwerte wurde die folgende Eichgerade (Abb.2.5) erstellt.

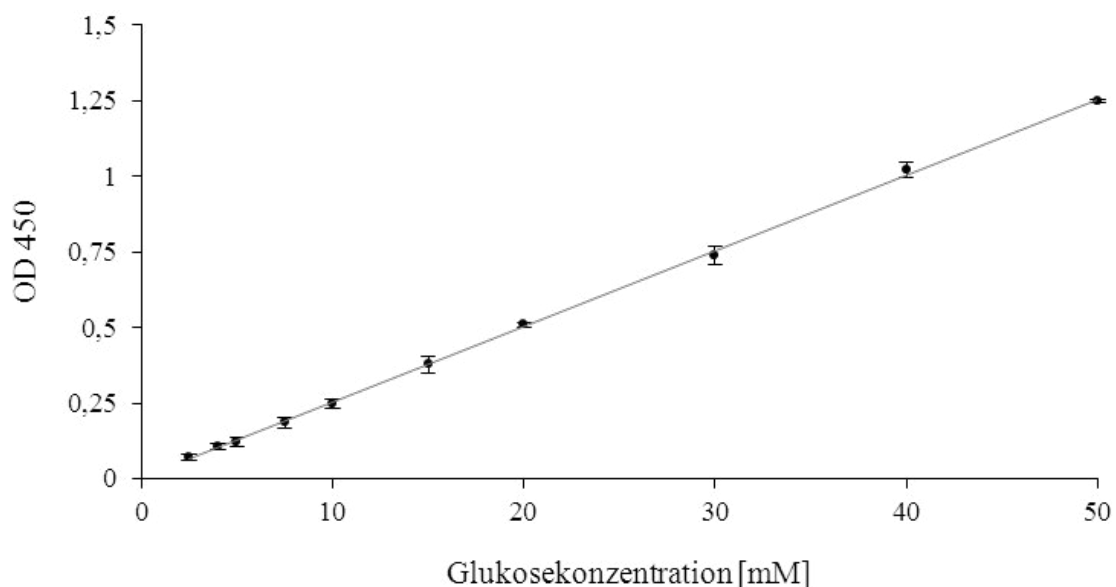


Abb. 2.5: Eichgerade zur Bestimmung der Glukose-Konzentration.

Die Messdaten wurden mittels Dreifach-Bestimmung ermittelt. Für die Umrechnung ergab sich die Formel: $\text{Glukosekonzentration} = (\text{OD}_{450} + 0,00237) / 0,02505$.

3 Ergebnisse

3.1 Die primäre Sporenagglomeration und ihr Beitrag zur Pelletbildung

Die Pelletbildung wurde in einem aus mehreren Schritten bestehenden Modell beschrieben, wobei die Zusammenlagerung von ruhenden, ungekeimten Sporen zu einem zunächst lockeren Agglomerat den ersten Schritt in diesem Prozess darstellt (Grimm *et al.* 2004, Kelly *et al.* 2006). Das Modell postuliert weiterhin, dass bereits diese erste Interaktion weitreichende Auswirkungen auf die Entwicklung des Pilzes in Flüssigkultur hat und sie bis hin zur finalen Pelletmorphologie beeinflussen kann.

In diesem Teil der Arbeit soll das Modell, vor allem aber der vorhergesagte Einfluss der primären Sporeninteraktion auf die endgültige Morphologie der Pellets, untersucht werden. Für die folgende Überprüfung der Hypothese soll daher ausschließlich die primäre Agglomeration der Sporen beeinflusst werden. Um diese spezifische Manipulation zu erreichen, wurde Melanin, ein Hauptbestandteil von *A. niger* Sporen ausgewählt, da dies zusammen mit anderen Komponenten die äußerste schützende Hülle der Sporen bildet. Des Weiteren wird die Melaninhülle während der Keimung abgeworfen, eine Veränderung der äußeren Hülle hat demnach keinen Einfluss auf die weitere vegetative Entwicklung von *A. niger* (Kap. 1.3.5). Um eine dauerhaft melaninfreie Sporenbildung zu gewährleisten, wurde dessen Biosynthese unterbrochen. Hierfür wurde das Gen *alb1*, deletiert, da die von dem Gen codierte Polyketidsynthase ALB1 den ersten Schritt der Biosynthese von Melanin in *A. niger* katalysiert.

3.1.1 Charakterisierung des *alb1*-Gens und Vergleich mit orthologen Genen

Das Gen An09g05730 wurde als *A. niger* Ortholog des *A. fumigatus* *pksP/alb1*-Gens durch Blast-Analyse (Altschul *et al.* 1990) identifiziert. *Alb1* umfasst im *A. niger*-

Genom 6680 bp und es werden vier Introns der Größe 50, 52, 57 und 59 bp vorhergesagt. Die Gensequenz codiert für ein 2153 Aminosäuren großes Protein, das ein theoretisches Molekulargewicht von 234 kDa aufweist (berechnet nach Zamyatnin 1984). Das Protein enthält drei für Polyketidsynthasen essentielle Domänen, die die Synthese eines linearen Polyketides katalysieren; zwei Acyltransferase-, eine Ketoacyl-Synthase- und zwei Acyl-Carrier-Protein-Domänen (Abb. 3.1). Des Weiteren enthält ALB1 eine Thioesterase-Domäne, welche die Bildung eines zyklischen Produkts aus den linearen Polyketid fördert.

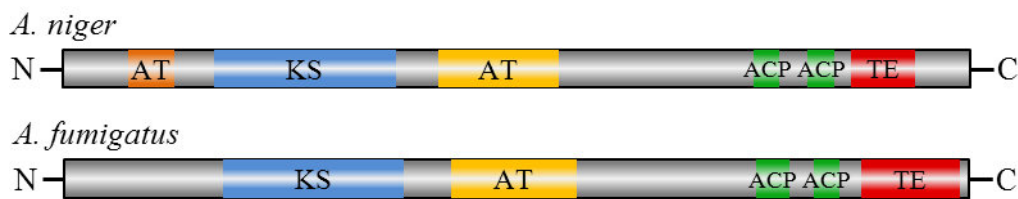


Abb. 3.1: Die Domänenstruktur von *A. niger* ALB1 ist annähernd identisch mit *A. fumigatus* ALB1. Die Acyltransferase (AT), Ketoacyl-Synthase (KS) und Acyl-Carrier-Protein (ACP) -Domänen stellen das Minimum an Grundbausteinen der Polyketidsynthasen dar. Die Thioesterase (TE) Domäne fördert den Ringschluss linearer Polyketide und ist daher essentiell für die Synthese von 1,8-Dihydroxynaphthalen, einem Zwischenprodukt der DHN-Melanin-Biosynthese.

Eine Sequenzanalyse mit Hilfe des NCBI Blast Algorithmus (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ergab, dass *A. niger* ALB1 zu 70% identisch mit *A. fumigatus* ALB1 ist. Berücksichtigt man zusätzlich ähnliche Aminosäuren stimmen die Proteine zu 82% überein. Die Strukturen der einzelnen Domänen sind hoch konserviert. Die Ketoacyl-Synthase-Domänen beider Proteine sind zu 88% identisch und zu 95% ähnlich. Die N-terminale Acyltransferase-Domäne von *A. niger* ALB1 existiert jedoch nicht im *A. fumigatus* Ortholog, die C-terminal gelegene ist zur Acyltransferase-Domäne aus *A. fumigatus* zu 71% identisch (86% ähnlich). Die Thioesterase-Domänen sind zu 82% identisch (90% ähnlich), die Acyl-Carrier-Protein-Domänen (vom N-Terminus) zu 78% bzw. 67% identisch (90% bzw. 80% ähnlich).

3.1.2 *Alb1* wird in sporulierenden Kulturen, nicht aber in ruhenden Sporen oder jungen Keimlingen exprimiert

Bevor das Gen *alb1* im Zuge der Untersuchung der Sporenzusammenlagerung deletiert wird, muss sichergestellt werden, dass die Polyketidsynthase in *A. niger* ausschließ-

lich an der Synthese von Melanin beteiligt ist und keine weiteren Aufgaben besitzt. Die Analyse ist wichtig, da unbekannte Funktionen des Proteins in den Sporen einen Einfluss auf die Entwicklung der Zusammenlagerung der Sporen haben könnten. Wäre dies der Fall, würden die aus den Versuchen gewonnen Ergebnisse möglicherweise zu falschen Schlussfolgerungen führen. Aus diesem Grund wird zunächst untersucht, ob *alb1* in Sporen bzw. jungen Hyphen während der für uns interessanten Phasen der primären und sekundären Sporenzusammenlagerung exprimiert wird.

Die Expressionsanalyse erfolgt durch qualitative RT-PCR. Hierfür wurden die *alb1*-spezifischen Primer alb1-RT-F und alb1-RT-R verwendet. Die Primer amplifizieren von der genomischen DNA ein 553 bp großes Fragment, das ein 50 bp großes Intron enthält. Von der cDNA wird entsprechend ein 503 bp großes Fragment amplifiziert. Die Qualitätskontrolle der eingesetzten genomischen DNA und cDNA erfolgte durch die Primer

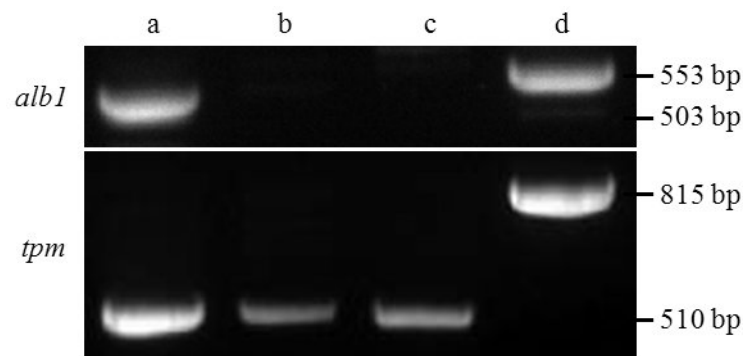


Abb. 3.2: RT-PCR Expressionsnachweis von *alb1*. PCR mit *alb1* spezifischen Primern und cDNA (A-C) bzw. genomischer DNA (D) als Template. Als Template-Kontrolle wurde das Tropomyosin codierende Gen *tpm* amplifiziert.

tpm-RT-F und *tpm*-RT-R. Sie amplifizieren von der genomische DNA ein 815 und von der cDNA ein 510 bp Fragment des Tropomyosin codierenden Gens (An13g00760).

Die Ergebnisse zeigen, dass das Polyketidsynthase-Gen während der Konidienbildung, aber nicht in ruhenden Sporen oder während der ersten sechs Stunden in Flüssigkultur exprimiert wird (Abb. 3.2). In der Flüssigkultur waren zum Probenzeitpunkt bereits viele Keimlinge und junge Hyphen vorhanden. Die Ergebnisse zeigen, dass Sporen, Keimlinge aber auch junge Hyphen ALB1 in Flüssigkultur nicht exprimieren. Alle Abweichungen im Verhalten und der Morphologie des Myzels, das aus den melaninlosen Sporen hervorgeht, im Vergleich zum Myzel, das aus den melaninhaltigen, Wildtyp-Sporen hervorgeht, sollten demnach in erster Linie den Veränderungen der Sporenoberfläche und der primären Sporenagglomeration zuzuordnen sein. Ein direkter Einfluss

von ALB1 auf die Sporenagglomeration kann daher mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, da es zu diesem Zeitpunkt nicht exprimiert wird.

3.1.3 Ausschaltung von *alb1* durch Gene-Replacement

Das *alb1*-Gen wurde in den *A. niger*-Stämmen AB1.13 und seinem Sucrase-überproduzierenden Abkömmling SKAn1015 (Zuccaro *et al.* 2008) deletiert. Die Ausschaltung erfolgte durch Gene Replacement (Abb. 3.3 A). Die Ausschaltkassette wurde mittels YRC hergestellt und war zum Zeitpunkt dieser Arbeit bereits in dem Vektor pRS426 vorhanden (Dietrich 2009). Die 3,5 kb große Kassette wurde als lineares Fragment mit Hilfe der Primer PKS-5-f und PKS-3-r amplifiziert. Sie enthält das *hph*-Gen aus *E. coli* unter Kontrolle des *A. nidulans trpC*-Promotors und Terminators sowie flankierend 1 kb der Sequenz „upstream“ vom *alb1*-ATG und 1 kb der Sequenz „downstream“ des *alb1*-Stoppcodons. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte auf Bottom-Agar mit Hygromycin als Selektionsmarker (Kap. 2.1.1). Bei beiden Stämmen zeigten bereits 10% der Primärtransformanten den Albino-Phänotyp. Jeweils drei Albino-Transformanten wurden ausgewählt und analysiert. Die homologe Integration der Ausschaltkassetten wurde mittels PCR mit den Primern PKS-test-f und *hph*-test-r überprüft, wobei ein 1,2 kb großes Amplifikat erwartet wurde. Alle Proben enthielten das erwartete Fragment. Die korrekte Integration sowie eine Kontrolle auf unerwünschte, heterologe Integrationen erfolgte mit Hilfe des Southern Blots (Abb. 3.3 b). Als Sonde wurde die 3,5 kb lange Ausschaltkassette eingesetzt.

Zwei der drei AB1.13 und alle drei SKAn1015 Transformanten zeigten die für die Deletion erwartete Bande bei 5,9 kb, ohne weitere Banden, die auf eine zusätzliche heterologe Integration der Kassette hindeuten würden. Zwei AB1.13 Transformanten (Abb. 3.3 B, links Spalte 1 und 2) sowie zwei SKAn1015 Transformanten (Abb. 3.3 B, rechts Spalte 1 und 2) wurden ausgewählt und als $\Delta alb1AB$ bzw. $\Delta alb1SK$ (1 bzw. 2) in die Stammsammlung aufgenommen. Abschließend wurde mittels PCR der homokaryotische Zustand der $\Delta alb1$ -Mutanten bestätigt.

Die folgenden Versuche wurden mit *alb1AB*(1) bzw. *alb1SK*(1) durchgeführt, aus diesem Grund werden die in dieser Arbeit verwendeten Stämme im Folgenden als *alb1AB* bzw. *alb1SK* bezeichnet. Das jeweils zweite Isolat wurde ausschließlich als Sicherheitskopie in die Stammsammlung aufgenommen.

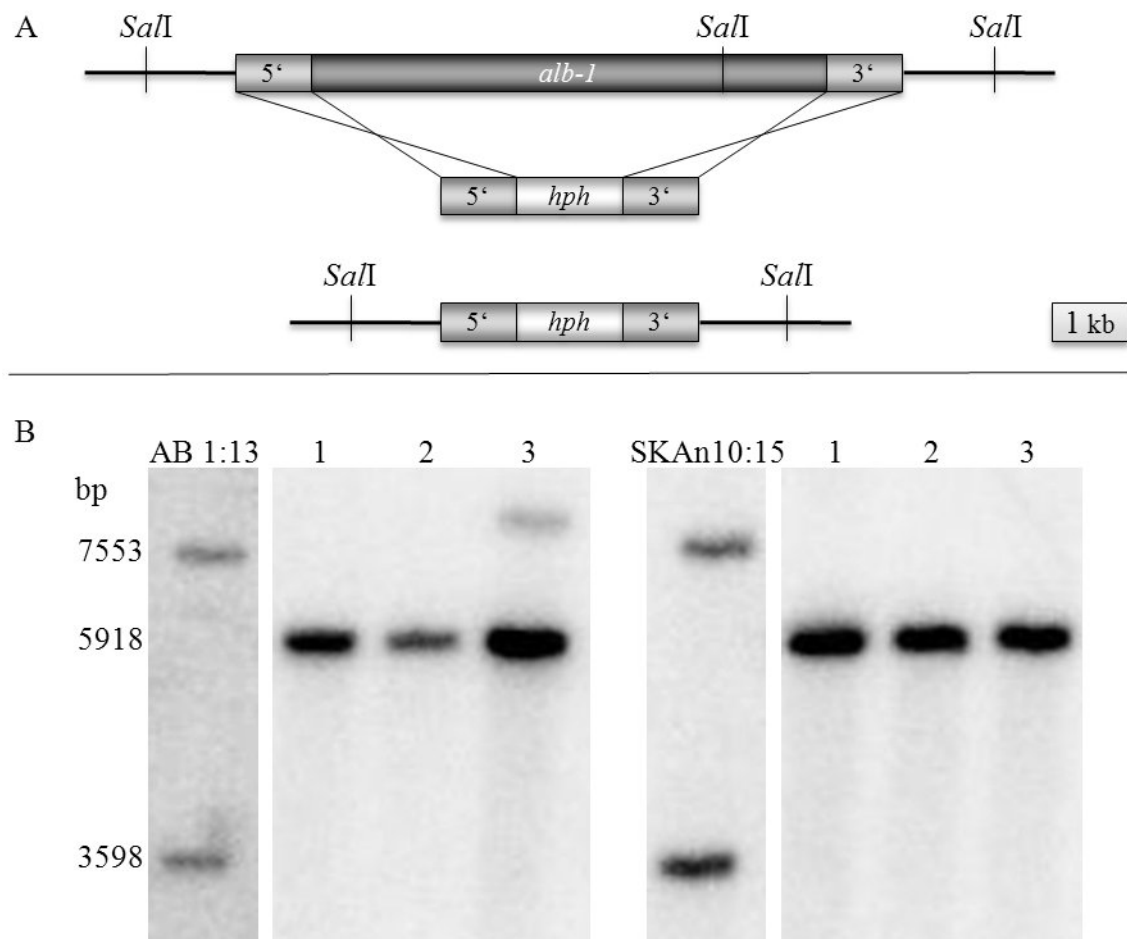


Abb. 3.3: Schematische Darstellung der *alb1*-Deletion und Southern Blot-Analyse. A: „Gene Replacement“ durch homologe Rekombination sowie Lage der *SalI*-Schnittstellen für die Southern Blot-Analyse. B: Southern Blot-Analyse vom Wildtyp (3598 und 7553 bp) und möglichen $\Delta alb1$ -Transformanten (5918 bp). Als Sonde diente die gesamte Ausschaltkassette.

3.1.4 Charakterisierung der $\Delta alb1$ -Mutanten

Bevor die Untersuchungen der primären Sporenagglomeration mit Hilfe der Albino-Sporen beginnen konnte, mussten die makroskopischen und mikroskopischen Eigenschaften der Sporen überprüft und charakterisiert werden. Nur mit Hilfe dieser Informationen ist das Aufstellen von Hypothesen und die spätere Interpretation der Ergebnisse möglich. Wie erwartet zeigen Konidien der $\Delta alb1$ -Stämme eine weißliche bis cremefarbene Färbung, was darauf hindeutet, dass kein Melanin in die äußere Zellwand eingelagert wird (Abb. 3.4). Die Anzahl der Konidien, die von der $\Delta alb1$ AB-Mutante ($2,1 \pm 0,2 \times 10^7$ Sporen/cm²) produziert wurden, war mit der des Wildtyp-Stammes AB1.13 ($2,1 \pm 0,1 \times 10^7$ Sporen/cm²) identisch. Auch auf die Keimungsrate hat die

Ausschaltung des *alb1*-Gens keinerlei Auswirkungen. Nach 6 h Inkubation bei 37°C auf festem Minimal-Medium waren $81 \pm 9\%$ der Wildtyp- und $83 \pm 9\%$ der Albino-Sporen gekeimt. Ähnlich verhält es sich mit der Hyphen-Wachstumsgeschwindigkeit. Sie lag bei $4,3 \pm 0,8$ mm/d für AB1.13 und $4,2 \pm 0,4$ mm/d für den $\Delta alb1$ AB-Stamm. Die Ausschaltung der Polyketidsynthase hat demnach keinen Einfluss auf die vegetative Entwicklung und Sporenbildung von *A. niger*.

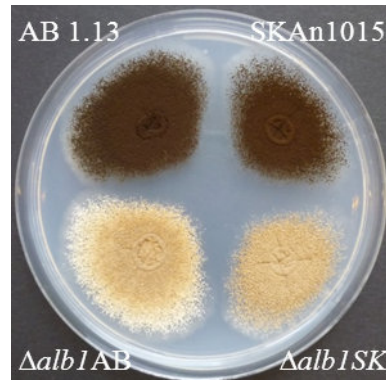


Abb. 3.4: $\Delta alb1$ -Mutanten fehlt die für *A. niger* typische dunkle Färbung. Dargestellt sind sechs Tage alte Kolonien auf Minimal-Medium.

3.1.5 $\Delta alb1$ -Konidien weisen eine veränderte Oberflächenstruktur auf

Bisher konnte nur beurteilt werden, dass sich die Sporenfärbung verändert hat, nicht aber, inwiefern die Ausschaltung von *alb1* sich auf die Oberflächenmorphologie der Sporen auswirkt. Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie wurden daher die Oberflächen der Sporen der unterschiedlichen Stämme miteinander verglichen. Zu diesem Zweck wurden Sporen der Stämme AB1.13, SKAn1015, $\Delta alb1$ AB und $\Delta alb1$ SK von fünf Tage alten, vollständig sporulierten Platten mit Wattestäbchen trocken geerntet und auf die Klebefläche von Pins übertragen. Die Sporen wurden anschließend im Vakuum mit Gold beschichtet und in einem Rasterelektronenmikroskop analysiert. Der Vergleich der Aufnahmen zeigt, dass die Oberfläche der Wildtyp-Sporen deutlich gefurcht und strukturiert ist (Abb. 3.5 C und D), die Oberfläche der Albino-Sporen weist dagegen eine unstrukturierte, glatte Oberfläche auf (Abb. 3.5 A und B).

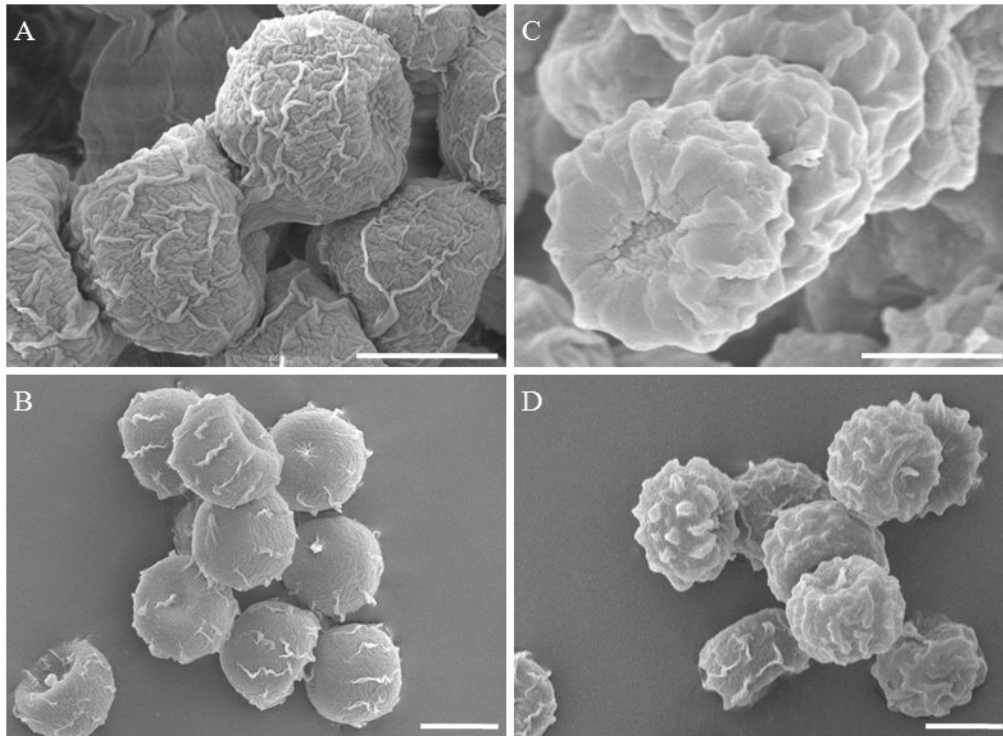


Abb. 3.5: Vergleich der Oberflächenstruktur von Albino- und Wildtyp-Sporen.
A: $\Delta alb1$ AB, B: $\Delta alb1$ SK, C: AB1.13 und D: SKAn1015. Größenstandard: 2 μ m.

Die Oberflächenstruktur von Konidien wurde demnach eindeutig verändert. Unklar bleibt jedoch weiterhin, inwiefern dies Auswirkungen auf die physikochemischen Eigenschaften der Sporen hat.

3.1.6 Die Hydrophobizität der $\Delta alb1$ - und Wildtyp-Sporen ist identisch

Das Ziel der Ausschaltung des *alb1*-Gens war es, die Sporenoberfläche vor allem um den Beitrag der Eigenschaften von Melanin zu verändern. Sollte die Ausschaltung die hydrophoben Eigenschaften der Sporen beeinflussen, muss dies im Vorfeld der Versuche festgestellt werden, da diese nachweislich einen Einfluss auf die Sporen- und Hypheninteraktion haben (Kap. 1.3.5). In diesem Abschnitt soll daher die Frage geklärt werden, ob die Ausschaltung des *alb1*-Gens einen Einfluss auf die hydrophoben Eigenschaften der Albino-Sporen hat. Sollte dies der Fall sein, müssten die späteren Analysen der primären Sporenagglomeration an diesen weiteren Einflussfaktor angepasst werden.

Die Hydrophobizität der Oberfläche wird in Pilzen hauptsächlich durch die Einlagerung hydrophober Proteine in die Zellwand erreicht. Diese werden entsprechend als Hydrophobine bezeichnet. Die Analyse der Hydrophobizität von AB1.13 und $\Delta alb1$ AB

erfolgte auf zwei Wegen. Zum einen wurde die Benässbarkeit der Sporenoberfläche, zum anderen die Verteilung der Sporen in einer Zwei-Phasen-Separations-Analyse untersucht. Der Benässbarkeits-Untersuchung beruht auf der Abstoßung von hydrophilen und hydrophoben Stoffen. Gibt man z.B. eine kleine Menge Wasser auf eine hydrophobe Oberfläche, lässt das Seitenverhältnis („Aspect-Ratio“) des sich bildenden Tropfens Rückschlüsse auf deren wasserabstoßende Eigenschaften zu. Da die Oberflächen weniger Tage alter *A. niger* Kulturen zumeist vollständig mit Sporen bedeckt sind, spiegeln entsprechend ermittelte Ergebnisse vollständig die Eigenschaften von Sporen wieder. Für die Untersuchung wurden jeweils 50 µl bidestilliertes Wasser auf vier Tage alte, vollständig mit Sporen bedeckte Kolonien von AB1.13, SKAn1015, sowie deren entsprechende Albino-Stämme gegeben (Kap. 2.3.6). Die Form des sich bildenden Wassertropfens wurde dokumentiert. Abschließend wurde das Seitenverhältnis ermittelt. Das Seitenverhältnis der Wassertropfen betrug auf AB1.13 und SKAn1015 1,44 zu 1 und auf $\Delta alb1$ AB und $\Delta alb1$ SK ergab sich ein Verhältnis von 1,43 zu 1. Somit sind keine Unterschiede in der Benässbarkeit zwischen Wildtyp- und Albino-Sporen erkennbar (Abb. 3.6).

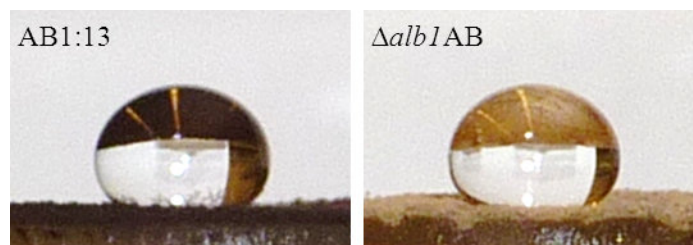


Abb. 3.6: Es konnten keine Unterschiede in der Benässbarkeit zwischen den Stämmen festgestellt werden. Für die Untersuchung wurde ein 50 µl Wassertropfen auf sporulierte AB1.13 und $\Delta alb1$ AB Kulturen gegeben.

Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde ein Zwei-Phasen-Separations-Assay (Rosenberg *et al.* 1980) durchgeführt (Kap. 2.3.6). Hierfür wird zunächst die optische Dichte einer wässrigen Sporensuspension bestimmt. Anschließend wird die Suspension mit Hexadekan überschichtet und kräftig vermischt. Nach einer 10-minütigen Ruhephase wird die optische Dichte der wässrigen Phase erneut vermessen. Die Abnahme der optischen Dichte in der wässrigen Phase ist dabei ein Maß für die hydrophilen bzw. hydrophoben Eigenschaften der Teilchen in der Lösung. Für alle Stämme wurde eine Verminderung der OD₄₀₀ der wässrigen Phase zwischen 40 und 50% ermittelt (Abb. 3.7). Entsprechend

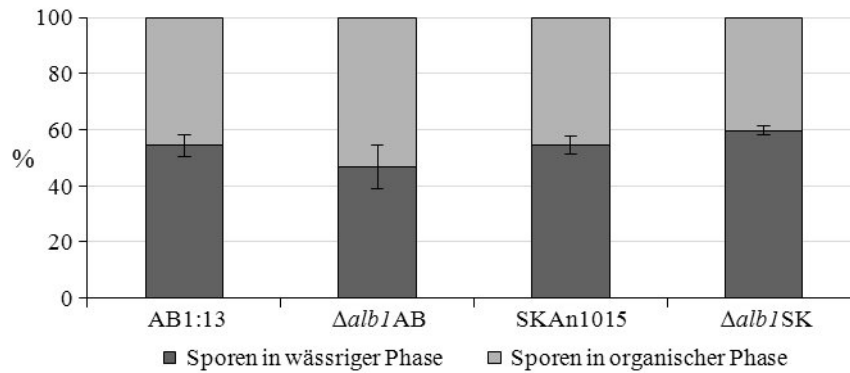


Abb. 3.7: Die hydrophoben Eigenschaften der Wildtyp- und der Albino-Stämme sind vergleichbar. Nach der Behandlung einer Sporensuspension mit Hexadekan befinden sich in allen Proben vergleichbare Mengen von Sporen in der wässrigen bzw. lipophilen Phase.

besitzen die Wildtyp- und die Albino-Sporen vergleichbare hydrophobe Eigenschaften. Beide Experimente zeigen, dass die Deletion von *alb1* keinen Einfluss auf die hydrophoben Eigenschaften der Sporenoberflächen hat.

3.1.7 Das Zeta-Potential von Albino-und Wildtyp-Sporen unterscheidet sich

Eine weitere Eigenschaft von Oberflächen ist ihre elektrische Ladung. Um diese festzustellen, wurde das Zeta-Potential von AB1.13 und $\Delta alb1AB$ -Sporen in Flüssigkultur ermittelt, eine Quantifizierung der Oberflächenladung von trockenen Sporen war nicht möglich. Vereinfacht und für das Verständnis der folgenden Versuche ausreichend, beschreibt das Zeta-Potential die Oberflächenladung von Partikeln in Flüssigkeiten.

Die Oberflächen von Sporen bestehen aus einer Vielzahl von Proteinen und chemischen Verbindungen. Die Protonierung von Teilen dieser Verbindungen, so z.B. von Glutaminsäure als Bestandteil von Proteinen, steht in einem Gleichgewicht mit der Hydroxonium-Ionenkonzentration (H_3O^+) des umgebenden Mediums. Das Zeta-Potential von Sporen ist somit direkt vom pH-Wert des Kulturmediums abhängig. Des Weiteren ist bekannt, dass Melanin unter Standardbedingungen eine negative Ladung aufweist. Demnach sollten unter identischen Bedingungen Sporen von $\Delta alb1AB$ eine positivere Ladung als Sporen von AB1.13 mit Melanin auf der Oberfläche aufweisen (Kap. 1.3.5).

Das Zeta-Potential wurde von AB1.13- und $\Delta alb1AB$ -Sporen bei unterschiedlichen

pH-Werten ermittelt (Abb. 3.8). Die Analyse erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Partikeltechnik und wurden von Andreas Wargenau durchgeführt. Die Messungen zeigten, dass Wildtyp-Sporen bei einem pH-Wert größer 2,0 ausschließlich negative Ladungswerte annehmen. Im Gegensatz dazu weist die Oberfläche der Albino-Konidien eine positive Ladung unterhalb eines pH-Wertes von 3,5 auf, oberhalb dieses Wertes nehmen die Konidien ebenfalls eine negative Ladung an. Der Betrag der negativen Ladung ist dabei deutlich geringer als beim Wildtyp, nähert sich diesem aber mit zunehmender Basizität an, sodass die Ladungen ab einem pH-Wert von 5,0 annähernd identisch sind. Es konnte demnach gezeigt werden, dass sich die Oberflächen der Sporen nicht nur morphologisch, sondern auch in ihren elektrostatischen Eigenschaften unterscheiden.

Für die Analyse der primären Sporenagglomeration müssen im Folgenden Bedingungen ausgewählt werden, bei denen ein Unterschied im Verhalten der Sporen in Flüssigkultur erwartet werden kann. Daher wurden für die weiteren Untersuchungen die pH-Werte 2,0 und 3,5 ausgewählt. Bei pH 2,0 beträgt die Oberflächenladung der Wildtyp-Konidien Null, die Konidien der $\Delta alb1$ -Stämme sind positiv geladen.

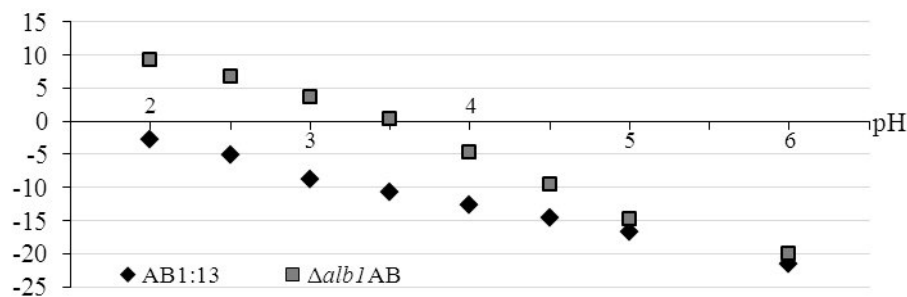


Abb. 3.8: Zeta-Potential von AB1.13 und $\Delta alb1AB$ in Flüssigkultur bei unterschiedlichen pH-Werten. Das Zeta-Potential stellt ein Maß für die Oberflächenladung von Partikeln in Flüssigkeiten dar.

Im Gegensatz dazu sind bei einem pH-Wert von 3,5 die Oberflächen der Wildtyp-Konidien negativ geladen und die Albino-Sporenoberfläche ist ungeladen (Abb. 3.8). Aufgrund der abstoßenden Kräfte von gleich geladenen Teilchen auf der einen Seite und dem Fehlen dieser Kräfte bei ungeladenen Sporen des jeweils anderen Stammes auf der anderen Seite, wird bei diesen Bedingungen am ehesten ein Unterschied bei der Sporeninteraktion in Flüssigkultur erwartet.

3.1.8 $\Delta alb1$ -Konidien zeigen ein verändertes Sporenagglomerationsverhalten

Basierend auf den Messungen des Zeta-Potentials gehen wir davon aus, dass die Wildtyp- und die $\Delta alb1$ -Sporen bei bestimmten pH-Werten ein unterschiedliches Aggregationsverhalten aufweisen. Bei einem pH von 2,0 ist bei den Wildtyp-Sporen nahezu keine Oberflächenladung messbar, Albino-Sporen dagegen sind deutlich positiv geladen. Daher sollten sich Wildtyp-Sporen unter diesen Bedingungen deutlich weniger abstoßen als die positiv geladenen Albino-Sporen und somit besser agglomerieren. Im Gegensatz dazu weisen Albino-Sporen bei einem pH-Wert von 3,5 nahezu keine Oberflächenladung auf, Wildtyp-Sporen sind bei diesem pH-Wert deutlich negativ geladen. Entsprechend werden bei diesem pH-Wert hohe Abstoßungskräfte bei den Wildtyp- und keine Abstoßungskräfte bei den Albino-Sporen erwartet. Bei einem pH-Wert von 3,5 sollten daher die Albino-Sporen besser aggregieren.

Zur Prüfung dieser Hypothese wurde die Aggregation von Wildtyp- und Albino-Sporen bei den vorhergesagten pH-Werten in Flüssigkultur untersucht. Es wurden jeweils 2×10^6 frisch geerntete und filtrierte Sporen pro ml eingesetzt. Die Analyse der Agglomeration erfolgte drei Stunden nach Versuchsbeginn (Kap. 2.3.4).

Die Ergebnisse bestätigten die Vorhersage der pH-Wert-abhängigen Zusammenlagerung. Bei einem pH-Wert von 2,0 interagierten 80% der AB1.13-Sporen mit mindestens einer weiteren Spore, aber nur 40% $\Delta alb1$ AB-Sporen (Abb. 3.9 A, B). Im Gegensatz dazu interagierten 80% der $alb1$ AB-Sporen bei einem pH-Wert von 3,5 mit mindestens einer weiteren Spore, die Interaktion der AB1.13-Sporen sank dagegen auf 50% (Abb. 3.9 C, D). Die Ergebnisse wurden durch die Stämme SKAn1015 und $alb1$ SK bestätigt. Dabei interagierten 93% der SKAn1015-Sporen bei einem pH-Wert von 2,0 und nur rund 55% der $\Delta alb1$ SK-Sporen. Wohingegen bei einem pH-Wert von 3,5 sich 94% der $\Delta alb1$ SK-Sporen zusammenlagerten aber weniger als 60% der SKAn1015-Sporen interagierten.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die primäre Sporenagglomeration in Flüssigkultur durch die Ausschaltung des $alb1$ -Gens pH-Wert abhängig verändert wurde.

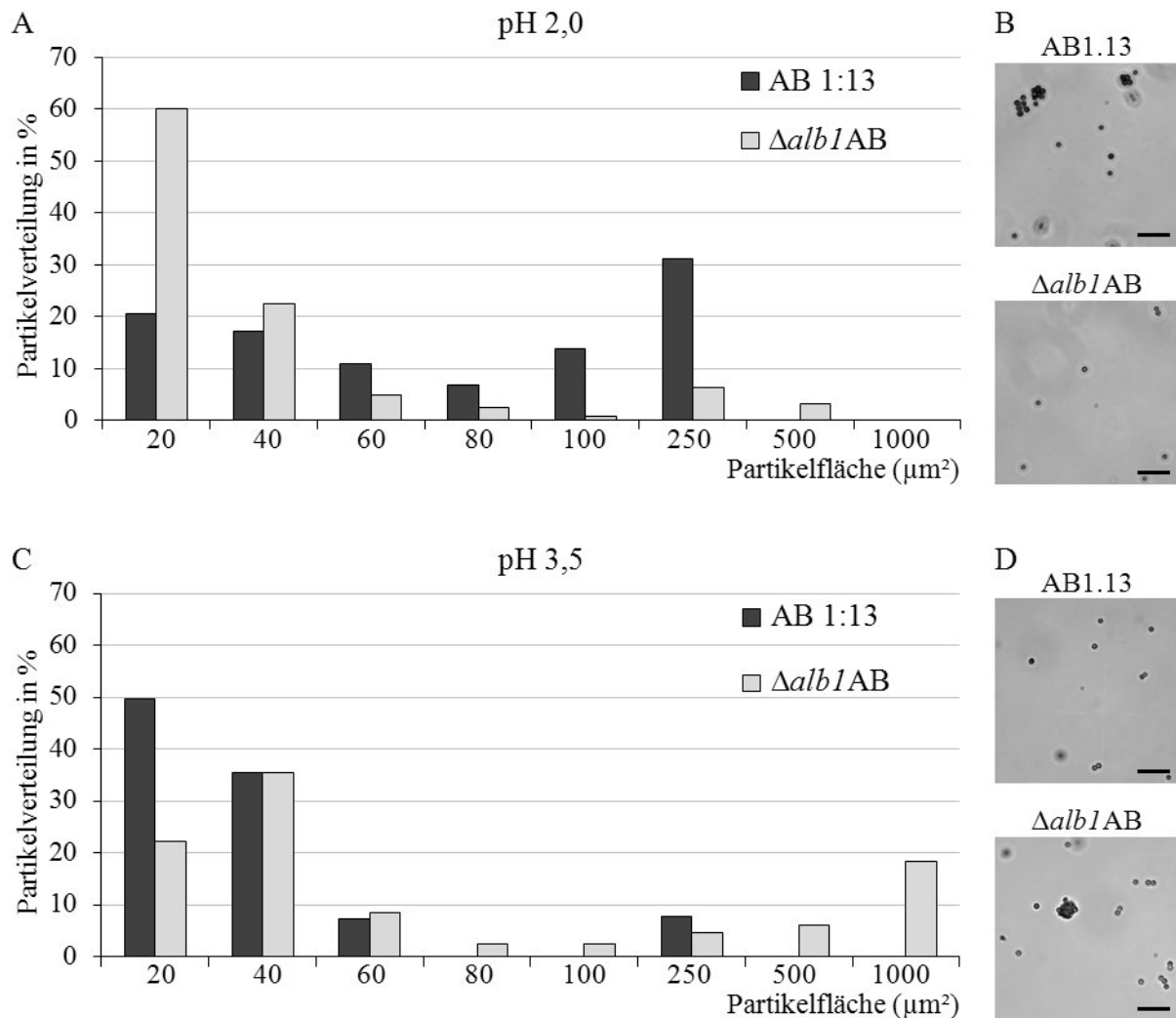


Abb. 3.9: $\Delta alb1AB$ -Sporen interagieren besser bei einem pH-Wert von 3,5, AB1.13-Sporen bei einem pH-Wert von 2,0. Die Übersicht stellt das Agglomerationsverhalten von Wildtyp- und Albino-Sporen bei pH 2,0 (A) und pH 3,5 (C) dar. Auf der x-Achse der Histogramme sind die gemessenen Partikelgrößen aufgetragen, wobei $20 \mu\text{m}^2$ eine einzelne Spore repräsentiert. Die y-Achse gibt flächenbezogen die relativen Häufigkeiten an, mit der eine entsprechende Partikelgröße gemessen wurde. Die Unterschiede in der Agglomeration sind auch in den mikroskopischen Aufnahmen erkennbar (B, D), die die Grundlage für die quantitative Auswertung bildeten. Größenstandard: $25 \mu\text{m}$.

3.1.9 Zeitliche Analyse der Sporenagglomeration

Neben der mikroskopischen Auswertung der Sporenagglomeration bestand auch die Möglichkeit einer sondengestützten Analyse. Dieses Verfahren bietet den Vorteil, dass die Sporenzusammenlagerung nicht nur zu wenigen Zeitpunkten, sondern kontinuierlich über den gesamten Versuchszeitraum dokumentiert werden kann. Daher ist es mit dieser Methode zum einen möglich, die bereits gewonnenen Ergebnisse der Sporenagglomeration zu bestätigen, zum anderen besteht die Möglichkeit eine weitere Hypothe-

se zum Ablauf der primären Sporenzusammenlagerung zu überprüfen. Die Hypothese postulierte, dass die primäre Sporenagglomeration ein sehr schnell ablaufender Prozess ist, welcher bereits nach wenigen Minuten abgeschlossen ist. Der Zusammenlagerung folgt eine stationäre Phase, in der es zu keinem weiteren Anwachsen der Agglomerate kommt. Diese Ruhephase wird erst durch das Einsetzen der sekundären Agglomeration beendet, in der die Agglomerate nach der Keimung der Sporen weiter anwachsen (Grimm *et al.* 2004, Ringel 2007).

Da die Messsonde (D600L-HC-K, LasenTec) für die Bestimmung der Partikelgröße eine gewisse Größe aufweist, werden die Versuche in 2,2 l Rührreaktoren durchgeführt. Im Vorfeld des Versuchs wurden Schwebstoffe aus dem verwendeten Minimal-Medium durch Sterilfiltration entfernt. Der pH-Wert wurde den Versuchsbedingungen entsprechend auf 2,0 bzw. 3,5 eingestellt und konstant gehalten. Die Sporen wurden ebenfalls filtriert, sodass Myzelreste und Konidiophore entfernt werden konnten. Ein Großteil der Sporen agglomerierte aufgrund ihrer hohen Konzentration bereits in den Sammelgefäßen, daher wurden die Sporen unmittelbar vor Versuchsbeginn durch eine einminütige Ultraschallbehandlung vereinzelt. Der Reaktor wurde anschließend mit 10^7 Sporen pro ml beimpft (Kap. 2.3.5). Die Rührgeschwindigkeit des Reaktors betrug 200 UpM, eine Begasung fand nicht statt.

Die Messung erfolgte während des gesamten Versuchszeitraums. Die ersten auswertbaren Datensätze entstanden allerdings erst einige Minuten nach dem Animpfen des Reaktors, nachdem sich die Versuchskultur homogenisiert hatte. Bei der Auswertung zeigte sich, dass nur die Messdaten der ersten Stunden verwertbare Ergebnisse lieferten, da es zu späteren Zeitpunkten zu Anlagerung von Sporen an den Messkopf kam, welche die späteren Messdaten unbrauchbar machten. Aus diesem Grund wurde für die Auswertung der pH-Wert abhängigen Zusammenlagerung zwei frühe Zeitpunkte gewählt. Trotz dieser Einschränkungen ist erkennbar, dass Wildtyp-Sporen bei pH 3,5 keinerlei Tendenz aufweisen, größere Agglomerate zu bilden. Dagegen ist bei pH 2,0 bereits nach 10 min eine deutliche Zusammenlagerung der Sporen erkennbar, welche kontinuierlich bis zum 30 min Messpunkt weiter anwächst (Abb. 3.10).

Überraschenderweise war eine Analyse der Zusammenlagerung der Albino-Sporen mit der LasenTec Sonde nicht möglich. Das optische Messverfahren der Sonde basiert auf der Reflexion von Licht durch Partikel, die den Messkopf passieren. Medium das mit

Wildtyp-Sporen beimpft wird, zeigt eine leichte aber deutlich erkennbare Trübung. Im Gegensatz dazu weist Medium, das mit der gleichen Konzentration an Albino-Sporen beimpft wird, keine optischen Veränderungen auf. Es ist daher möglich, dass die Albino-Sporen in Medium keine ausreichende Reflexion verursachen und aus diesem Grund nicht von der Sonde erkannt wurden.

Aufgrund der Einschränkungen war eine genauere Analyse der Daten nicht möglich. Für den Wildtyp können allerdings die Messergebnisse der pH-Wert abhängigen primären Sporenagglomeration aus Kapitel 3.1.8 bestätigt werden. Eine Aussage über den zeitlichen Verlauf der primären Sporenagglomeration ist mit der geringen verwertbaren Datenmenge nicht möglich.

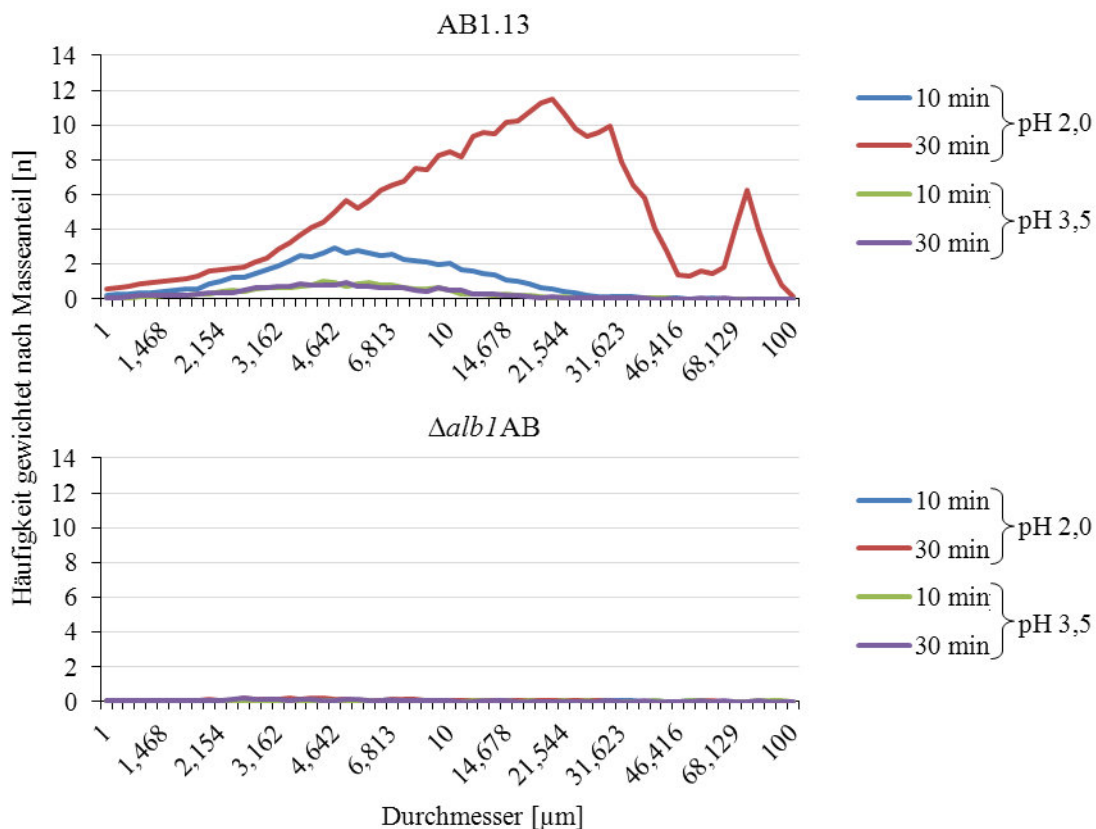


Abb. 3.10: Übersicht des zeitlichen Verlaufs der primären Sporenagglomeration.

Die Diagramme stellen die Häufigkeit (y-Achse) von detektierten Sporenagglomerate entsprechend ihrer Größe (x-Achse) nach 10 und 30 min bei pH 2,0 und 3,5 dar. Für AB1.13 ist bei pH 2,0 eine deutliche Zunahme der Partikelgrößen zwischen der 10 und 30 Minuten Messung erkennbar. Bei pH 3,5 waren keine Veränderungen messbar. $\Delta alb1AB$ -Sporen konnten mit der LasenTec Sonde nicht detektiert werden.

3.1.10 Eine veränderte Sporenaggregation hat keinen Einfluss auf die abschließende Pelletgröße und -struktur

Der Prozess der Pelletbildung wurde für *A. niger* in zwei Schritte unterteilt. Dabei wird davon ausgegangen, dass die primäre Agglomeration von ungekeimten Sporen einen Einfluss auf die folgende Sporen-Sporen- bzw. Sporen-Hyphen-Anheftung hat und dadurch die finale Pelletstruktur beeinflusst (Grimm *et al.* 2004, Kelly *et al.* 2006). Ausgehend von dem Modell sowie den beobachteten unterschiedlichen Aggregationsverhalten der Wildtyp- und Albino-Sporen, sollte sich der Prozess der Pelletbildung, aber auch die finale Pelletmorphologie zwischen AB1.13 und $\Delta alb1$ AB pH-abhängig unterscheiden.

Zur Überprüfung dieser Annahme wurde die weitere Entwicklung der in Kapitel 3.1.8 analysierten Ansätze betrachtet sowie Proben nach 6 h bzw. 9 h analysiert. Weder die Wildtyp- noch die Albino-Sporen waren bei pH 2,0 in der Lage, innerhalb dieser Zeitspanne zu keimen. Ihr Aggregationsverhalten blieb weiterhin dem der 3 h Probe. Aus diesem Grund wurden diese Proben bei den folgenden Analysen vernachlässigt. Im Gegensatz dazu waren nach 6 h sowohl die Wildtyp- als auch die Albino-Sporen in den bei pH 3,5 kultivierten Proben gekeimt. Interessanterweise zeigten beide Stämme dabei vergleichbare Aggregate aus Sporen und jungen Hyphen (Abb. 3.11 A). Dies deutet darauf hin, dass die sekundäre Sporenagglomeration bzw. Aggregation unabhängig von den Ergebnissen der primären Sporenagglomeration verläuft, und diese nach der Keimung keinen weiteren Einfluss auf die Sporen-Sporen bzw. Sporen-Hyphen-Interaktion hat.

Um vollständig entwickelte Pellets analysieren zu können, wurden Sporen der verschiedenen Stämme für 48 h bei pH 3,5 kultiviert. Die Morphologie der Wildtyp- und Albino-Pellets war identisch. Auch mikroskopische Untersuchungen von Pelletschnitten, die eine genauere Analyse des inneren Aufbaus der Pellets erlauben, zeigten keinerlei Strukturunterschiede zwischen den Stämmen (Abb. 3.11 B).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Zusammenlagerungen der primären Sporenagglomeration keinen Einfluss auf den weiteren Verlauf der Pelletentwicklung haben. Sie werden vielmehr von der sekundären Sporenagglomeration überschrieben.

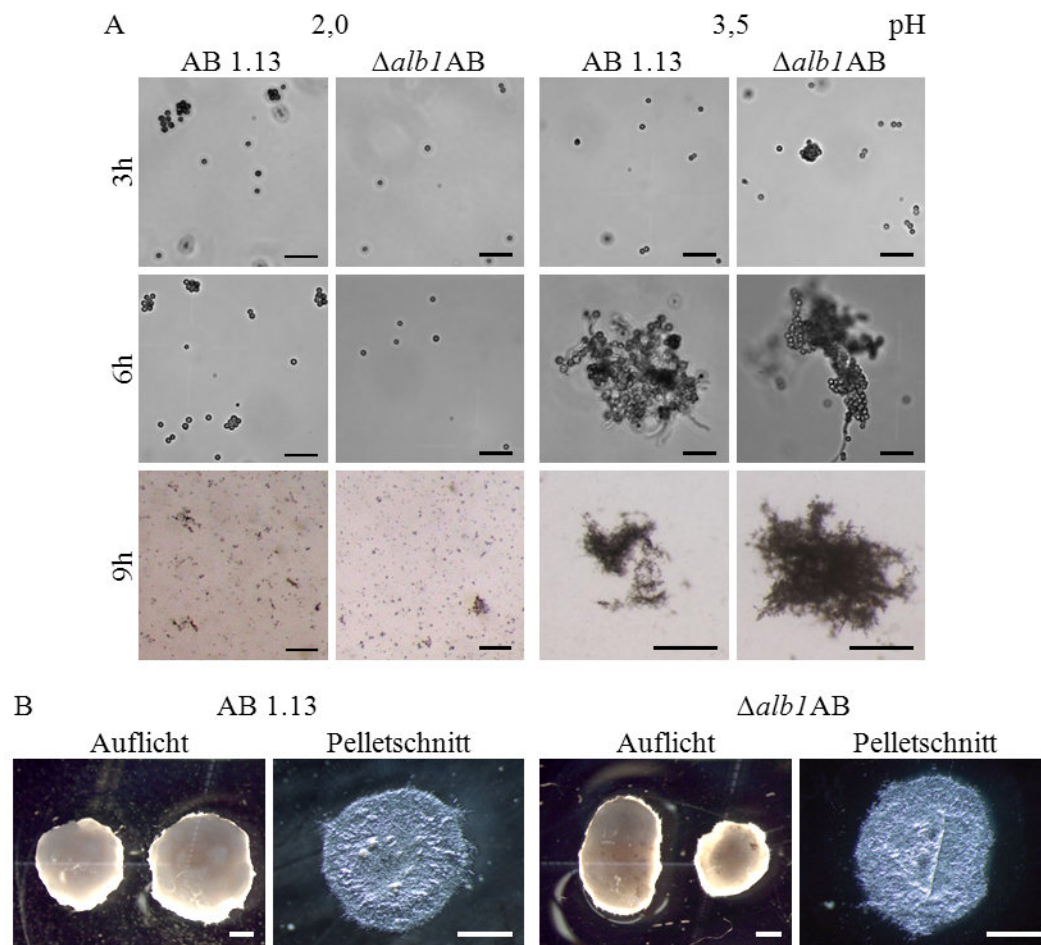


Abb. 3.11: Die sekundäre Sporenaggregation sowie die finale Pelletstruktur sind von der primären Sporenagglomeration unabhängig. A: Sporen-Sporen bzw. Sporen-Hyphen-Interaktion von AB1.13- und $\Delta alb1$ AB-Sporen nach drei, sechs und neun Stunden bei pH 2,0 und 3,5. B: Äußere Pelletstruktur und Pelletschnitt von AB1.13 und $\Delta alb1$ AB nach einer Kultivierung von 48 Stunden in Minimal-Medium bei pH 3,5. Größenstandard A 3, 6 h: 25 μ m, 9 h: 0,5 mm, B : 1 mm.

3.1.11 Die Sukrase- und Glucoamylaseproduktivität von $\Delta alb1$ - und Wildtyp-Stämmen in Flüssigmedium unterscheiden sich nicht.

Die Produktausbeute in biotechnologischen Anwendungen wird stark von der Morphologie, die der Produktionsorganismus annimmt, beeinflusst (Kap. 1.3.2). Obwohl kein Unterschied in der Morphologie der Wildtyp- und Albino-Pellets erkennbar war, wird dennoch im Folgenden untersucht, ob die veränderte primäre Sporenagglomeration die Produktivität der Stämme beeinflusst.

Verglichen wurde die Glucoamylase-Aktivität zwischen den Stämmen AB1.13 und

alb1AB und die Sukrase-Aktivität zwischen den Stämmen SKAn1015 und *alb1SK*. Analysiert wurde dabei sowohl die jeweilige Biomasse assoziierte Enzymaktivität als auch die Aktivität im Überstand. Die Proben wurden 48 Stunden nach Inkubationsbeginn genommen.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen des Pelletvergleichs konnten keine signifikanten Unterschiede in der Enzymaktivität zwischen den Albino-Mutanten und den Wildtyp-Stämmen nachgewiesen werden (Abb. 3.12).

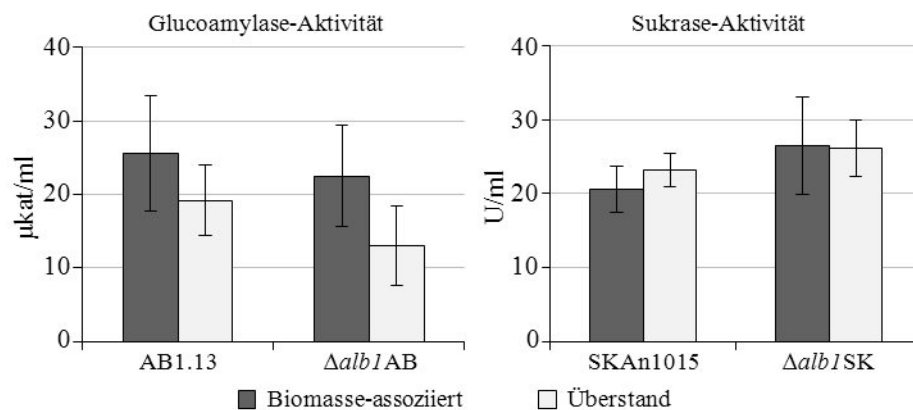


Abb. 3.12: Eine veränderte primäre Sporenagglomeration hat keinen Einfluss auf die Glucoamylase- und Sukrase-Aktivität. Die y-Achse stellt die jeweilige Biomasse-assoziierte Enzymaktivität bzw. Aktivität im Überstand der untersuchten Stämme dar.

3.1.12 Sporen ohne Melanin zeigen eine verbesserte Oberflächenanhaftung

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Sporen und das Myzel von *A. niger* in der Lage sind, sich submers an polymere, faserige und raue Oberflächen anzuhängen und Biofilme zu bilden (Villena und Gutiérrez-Correa 2006). Ähnlich dem Verlauf der Pelletbildung unterteilt sich die Biofilmbildung in mehrere Phasen. In der ersten Phase kommt es zu einer Anheftung der ungekeimten Sporen an die Oberfläche, in der zweiten folgt die Anlagerung der Keimschläuche und Hyphen. Für die morphologische Entwicklung der Biofilme spielen dabei definierte äußere Einflüsse eine wichtige Rolle. So müssen für dessen Bildung die Kulturen zuerst ruhen, sodass sich die Sporen absetzen und an die Trägerfläche anheften können. Nach der Keimung streben die Hyphen, entgegen der Schwerkraft, der Flüssigkeitsoberfläche entgegen, sodass die Kulturen vorsichtig geschwenkt werden müssen, um die Keimschläuche und Hyphen nach unten, gegen

die Trägerfläche zu drücken. Im Laufe der Kultivierung kommt es im Anschluss durch die Sekretion von Adhäsinen zu einer aktiven Anheftung der Hyphen an die polymere Trägeroberfläche (Villena *et al.* 2010).

Im Gegensatz zur Pelletbildung, kann bei der Biofilmentwicklung weiterhin davon ausgegangen werden, dass die primäre Sporenanheftung an der Oberfläche des Trägermaterials substantiell für die Entstehung eines Biofilms ist. Im Folgenden ergab sich daher die Frage, ob die Veränderung der Sporenoberfläche der Albino-Sporen einen Einfluss auf die Anheftung an polymere Oberfläche hat und inwiefern eventuelle Unterschiede zum Wildtyp sich in der Morphologie des entstehenden Myzels widerspiegeln.

Für die Untersuchung der Sporenanheftung an polymere Oberflächen wurden Petrischalen aus Polysterol mit 20 ml flüssigem Minimal-Medium und 10^7 Sporen von AB1.13, SKAn1015, $\Delta alb1$ AB bzw. $\Delta alb1$ SK pro ml beimpft. Die Kulturen ruhten zunächst bei 37°C für 4,5 Stunden, sodass die Sporen Gelegenheit hatten sich an die Oberfläche anzuheften (s.Abb. 3.13 A). Im Anschluss an diese Ruhephase wurde die Inkubation auf einem Schüttler fortgeführt und die Kulturen bei 35 bis 40 UpM geschwenkt.

Nachdem die Kulturen 22,5 Stunden geschwenkt wurden, befand sich der Großteil der Wildtyp-Biomasse frei schwimmend im Medium und begann mit der Bildung pelletähnlicher Strukturen. Dagegen blieb das Myzel der Albino-Stämme an der Polymer-Oberfläche angeheftet. Dabei zeigte sich, dass viele Hyphen vom Boden aus ins Medium ragten und scheinbar ausschließlich durch die zuvor stattgefundene Adhäsion der Sporen mit dem Boden der Petrischale verbunden waren. Die Kultivierung wurde weitere 33 Stunden fortgesetzt, sodass das Myzel seine endgültige Morphologie annehmen konnte. Dabei zeigte sich, dass die abgelösten Sporen von AB1.13 sich zu Strukturen, eher vergleichbar mit Pellets als mit Biofilmen, entwickelten. Eine Kompensierung des Ablösens der Sporen, wie sie im Verlauf der sekundären Sporenagglomeration während der Pelletentwicklung beobachtet werden konnte, fand demnach nicht statt. Die Albino-Sporen des $\Delta alb1$ AB-Stammes entwickelten sich im Gegensatz dazu zu einem geschlossenen Biofilm. Nur wenig Biomasse befand sich frei schwimmend im Medium. Diese Ergebnisse wurden auch durch Versuche mit den Stämmen SKAN1015 und $\Delta alb1$ SK bestätigt (Abb. 3.13 B).

Die Fähigkeit der Albino-Mutanten, unter definierten Bedingungen eher Biofilme zu bilden als der Wildtyp, ist reproduzierbar. Es zeigte sich allerdings, dass bei verlängerter ruhender Inkubation auch der Wildtyp in der Lage war, Biofilme zu formen. Erhöhte man dagegen die Schüttel-Geschwindigkeit auf 70 UpM bildeten auch die Albino-Mutanten frei schwimmendes Myzel.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Albino-Mutanten eine verbesserte Sporen-Anheftung an polymeren Oberflächen aufweisen. Der eng definierte Bereich, in dem diese Verbesserung zum Tragen kommt, zeigt aber auch, dass andere Faktoren, die durch die Entfernung des Melanins nicht verändert wurden, wahrscheinlich einen größeren Beitrag zur Biofilmbildung leisten.

Abschließend kann daher basierend auf diesen Ergebnisse angenommen werden, dass die primäre Sporenadhäsion einen grundlegenden Schritt bei der Biofilmbildung auf glatten, polymeren Oberflächen darstellt.

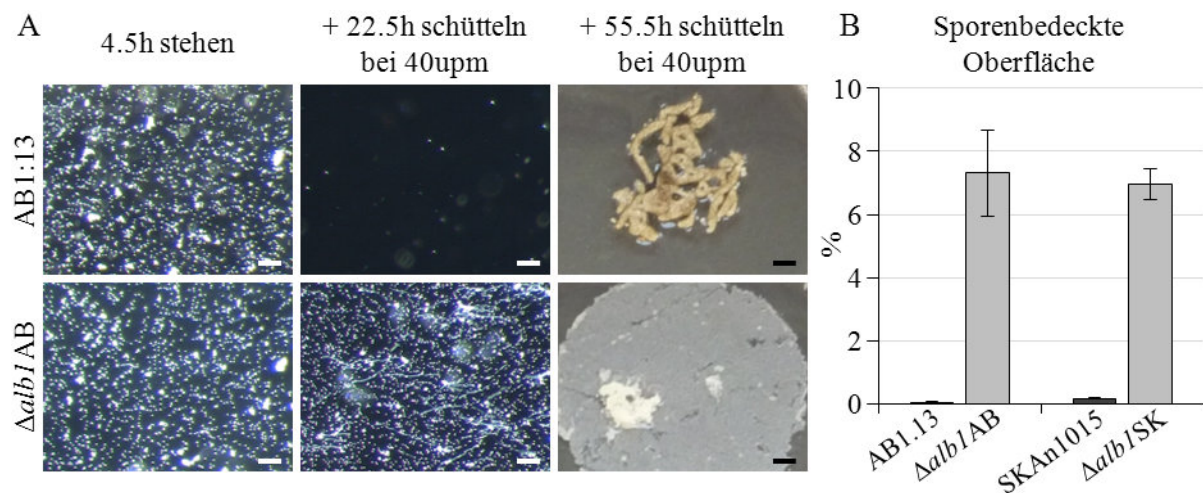


Abb. 3.13: Albino-Sporen zeigen eine verbesserte Anheftung an polymere Oberflächen als Wildtyp-Sporen. A: Sporenbedeckung des Bodens von Petrischalen nach 4,5 und 27 Stunden sowie Myzelmorphologie nach 60 Stunden. B: Quantifizierung der Bodenbedeckung 27 Stunden nach Inkubationsbeginn. Balken: A, B: 100 μ m, C: 5 mm.

3.1.13 Biofilme produzieren im Vergleich zu Pelletkulturen mehr Glucoamylase

Bei der Biofilmentwicklung wurde erstmals ein deutlicher morphologischer Unterschied zwischen den Wildtyp- und den Albino-Stämmen sichtbar, der auf die Veränderung der Sporenoberfläche zurückzuführen ist. Da die Produktivität biotechnologischer Produktionsprozesse stark von der Morphologie beeinflusst wird, wurde im Folgenden untersucht, ob Unterschiede bei der Glucoamylase-Aktivität in Proben aus Biofilm- und Pellet-Kulturen feststellbar sind.

Für die Analyse wurden Proben aus den Überständen von 48 Stunden alten Kultivierungen entnommen. Des Weiteren wurde die Trocken-Biomasse der jeweiligen Kultivierung ermittelt.

Dabei zeigte sich, dass die Überstände der Biofilme eine signifikant höhere Glucoamylase-Aktivität aufwiesen. Dies ist umso interessanter, da die Biofilme zusätzlich eine leicht reduzierte Biomasse im Vergleich zu den Wildtyp-Pellets hatten. (Abb. 3.14).

Betrachtet man diese Ergebnisse vergleichend mit den Ergebnissen der Albino- und Wildtyp-Pellet-Untersuchungen zeigt sich, dass die Unterschiede der gemessenen Glucoamylase-Aktivität der Biofilmkultivierung nicht auf die Ausschaltung des *alb1*-Gens zurückzuführen ist. Die deutliche Steigerung liegt vielmehr in der veränderten Morphologie und den veränderten Kultivierungsbedingungen der Biofilme im Vergleich zu denen der Pellets begründet.

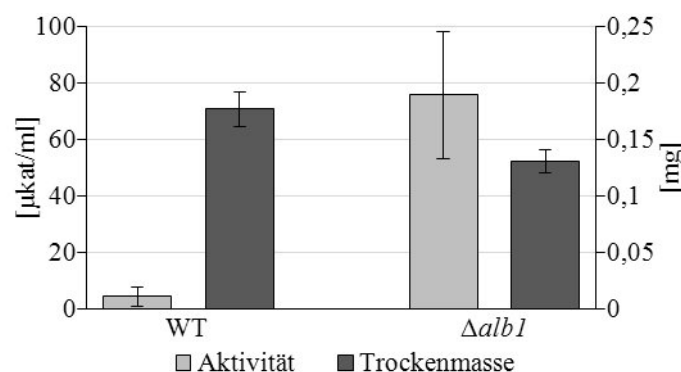


Abb. 3.14: Vergleich der Glucoamylase-Aktivität von Wildtyp-Pellets und Δalb1 AB-Biofilm Kulturen. Die Trockenmasse sowie die Glucoamylase-Aktivität des Überstandes wurden nach 48 Stunden Inkubation bestimmt. Linke Y-Achse: Aktivität, rechte Y-Achse: Trockenmasse.

3.1.14 Stoffwechselaktive Bereiche in Biofilmen

Um ein besseres Verständnis der Entwicklung und des Aufbaus von Biofilmen zu erhalten, wurden sie im Laufe der Untersuchungen auch über längere Zeiträume kultiviert und untersucht. Dabei war zum einen eine kontinuierliche Biomassezunahme erkennbar, zum anderen kam es ab dem sechsten Inkubationstag vermehrt zu Ablösungen der Hyphen vom Trägermaterial, was zur Zerstörung des Biofilms führte.

Aus Pelletanalysen ist bekannt, dass sich ab einem bestimmten Durchmesser eine Todzone innerhalb eines Pellets entwickelt (Hille *et al.* 2005). Dies liegt vor allem an der Sauerstoff- sowie Nährstoffversorgung, da die äußeren, jungen Bereiche der Pellets den Sauerstoff und die Nährstoffe verbrauchen und somit ab einer bestimmten Größe keine Versorgung der inneren Bereiche mit diesen lebenswichtigen Komponenten mehr erfolgt.

Im Folgenden sollte daher untersucht werden, ob sich im Laufe der Biofilmentwicklung abgestorbene Bereiche bilden. Dabei kommt der Analyse zu Gute, dass abgestorbene Bereiche anhand ihrer mangelnden Stoffwechselaktivität leicht von lebenden Bereichen unterschieden werden können. Für die Analyse wurde der Stamm *Ppki-gfpAB* ausgewählt. Der Stamm exprimiert in stoffwechselaktiven Bereichen kontinuierlich zytoplasmatisches GFP. *Ppki-gfpAB* ging aus dem Stamm AB1.13 durch Transformation mit dem Plasmid pARAn37 mit *gfp* als Insert hervor und stand zu Beginn dieser Arbeit bereits zur Verfügung. Er unterscheidet sich von AB1.13 weder in Morphologie noch im Verhalten.

Für die Untersuchungen wurde der Stamm unter Biofilm-bildenden Bedingungen kultiviert. Vom dritten bis zum siebenten Kultivierungstag wurde das Medium täglich ausgetauscht und Proben für die mikroskopische Analyse des Querschnitts und der GFP-Expression des Biofilms angefertigt. Bei der Fluoreszenzmikroskopie wurde vor allem in den oberen 400-500 µm des Biofilms ein starkes GFP-Signal detektiert. Das Signal nahm in tieferen Schichten deutlich ab und konnte vor allem in älteren Bereich nicht mehr detektiert werden (Abb. 3.15).

Dies deutet darauf hin, dass es in Biofilmen, wie schon für Pellets beschrieben, mit zunehmender Schichtdicke zur Bildung von Bereichen ohne erkennbare Stoffwechselaktivität kommt und die somit als tot angesehen werden können.

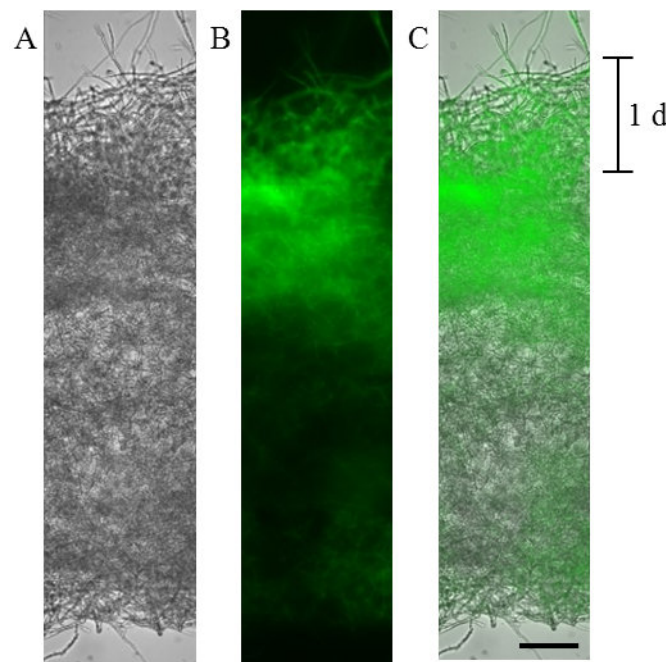


Abb. 3.15: Stoffwechselaktivität eines sechs Tage alten Biofilms. Hellfeldaufnahme des Biofilm-Querschnitts von dessen Oberseite bis zum Boden (A). Das zytoplasmatische GFP-Signal des Stammes *Ppki-gfpAB* diente als Maß für dessen Stoffwechselaktivität (B). C) Überlagerung beider Aufnahmen. Der vertikale Standard stellt das ungefähre Tageswachstum dar. Größenstandard: 100 μm .

3.1.15 *fwn*, die klassische $\Delta alb1$ -Mutante

Farbmutanten von *A. niger* wurden bereits vor 60 Jahren als Marker für die Erstellung von Genkarten verwendet (Pontecorvo *et al.* 1953). Eine dieser Mutanten ist *fwn*, sie ist äußerlich nicht von den $\Delta alb1$ -Mutanten unterscheidbar. Folglich wurde zu Beginn dieser Arbeit vermutet, dass es sich bei der *fwn*-Mutante um eine Mutation im *alb1*-Gen handelt.

Um diese Vermutung zu bestätigen, sollte zum einen versucht werden, die klassische *fwn*-Mutante mit Hilfe des *alb1*-Gens zu komplementieren, zum anderen sollte die exakte Mutation durch Sequenzierung von *alb1* in der *fwn*-Mutante bestimmt werden.

Im Laufe dieser Arbeit wurden gleich zwei Artikel, die sich mit der *fwn*-Mutante beschäftigten, parallel zu den Untersuchungen dieser Arbeit veröffentlicht. Sie bestätigten die Vermutung, dass es sich bei der *fwn*-Mutante um das *alb1*-Gen handelt (Jørgensen *et al.* 2011, Chiang 2011). Im Folgenden wurde aufgrund der Veröffentlichungen von einer Komplementierung der *fwn*-Mutante mit dem *alb1*-Gen abgesehen.

Da keine der beiden Publikationen die exakte Mutation von *alb1* in *fwn* beschrieb,

wurde das *fun*-Gen isoliert und sequenziert. Dabei wurde mit Hilfe des Primers pks-Seq-2-For 400 eine Transversion von Adenin zu Thymin an der genomischen Position 624 (cDNA 574) festgestellt. Der Austausch bewirkt eine Nonsense-Mutation von Lysin 192 (AAG) zu einem Stoppcodon (TAG). Die Mutation befindet sich in der Acyltransferase-Domäne der Polyketidsynthase.

3.2 Die MAP-Kinase MAKB, ein Regulator der Sporenbildung in *Aspergillus niger*

Die Kinase MAKB wurde bisher in *A. niger* nicht beschrieben. Ihre orthologen MAP-Kinasen MpkB aus *A. nidulans* und Tvk1 aus *T. virens* waren dagegen bereits mehrmals Gegenstand von Veröffentlichungen. Für MpkB konnte dabei eine Beteiligung an der Regulierung der Expression von Sekundärmetaboliten gezeigt werden. Tvk1 aus *T. virens* reguliert u.a. die Expression hydrophober Zellwandproteine und ist an der Steuerung der Konidien-Bildung beteiligt. So differenzieren und sporulieren im Gegensatz zum Wildtyp $\Delta tvk1$ -Stämme in Flüssigkultur. Interessanterweise unterscheiden sich die unter diesen Bedingungen gebildeten Konidien deutlich von *T. virens* Konidien die unter Standardbedingungen gebildet werden u.a. durch eine deutlich erhöhte Hydrophobizität. Sollten *A. niger* *makb*-Deletionsmutanten diese Eigenschaften teilen, wäre dies zum einen für weitere Analysen der Pellet-Morphologie, aber auch für ein besseres Verständnis der Expression von Sekundärmetaboliten interessant.

3.2.1 Charakterisierung von *makb* und *ste7*

Das Gen An08g10670, im Folgenden *makb*, wurde mittels Blast-Analyse als *A. niger* Ortholog der Kinase Fus3 aus *S. cerevisiae* identifiziert. Der ORF von *makb* umfasst im Genom 1216 bp. Durch Sequenzierung von *makb*-cDNA sowie dem Vergleich mit der genomischen *makb*-Sequenz konnten drei vorhergesagte Introns der Größe 55, 49 und 47 bp bestätigt werden. Das berechnete Molekulargewicht der Kinase entspricht 41 kDa. Ein Alignment von MAKB und Fus3 aus *S. cerevisiae* ergibt eine Übereinstimmung von 61% zwischen beiden Sequenzen. Berücksichtigt man bei diesem Vergleich zusätzlich Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften, kommt man zu einer Übereinstimmung von 78%. Die funktionellen Domänen sind erwartungsgemäß deutlich konservierter. Die Substrat- und ATP-Bindungsstellen sind 100% identisch. Das Kinase-Interaktions-Motiv stimmt mit dem von Fus3 zu 86% überein, wobei die Abweichungen durch Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften verursacht werden. Ein teilweise erheblicher Unterschied wurde dagegen in den drei funktionellen Bereichen des „Activation Loops“ festgestellt. In den ersten beiden stimmen nur sieben von elf bzw. zwei von sieben Aminosäuren überein, nur der dritte Bereich, die Phosphorylie-

rungsstelle, ist zu 100% konserviert.

Zur Bestätigung der Ergebnisse der Untersuchung von MAKB wurde zusätzlich die der MAP-Kinase übergeordnete MAP-Kinase-Kinase STE7 betrachtet. Dabei wurde das Gen An11g10690 als *A. niger ste7*-Ortholog des *ste7*-Gens aus *S. cerevisiae* mittels Blast-Analyse identifiziert. Der ORF von *ste7* ist 1813 bp lang und enthält drei durch cDNA-Sequenzierung bestätigte Introns von 76, 67 und 68 Basenpaaren. Die translatierte Kinase besteht aus 533 Aminosäuren und weist eine Masse von 58,1 kDa auf. Im Vergleich zu MAKB und Fus3 sind STE7 aus *A. niger* und Ste7 aus *S. cerevisiae* deutlich weniger konserviert. 43% der STE7-Sequenz aus *A. niger* stimmen mit der *S. cerevisiae* Ste7-Sequenz überein, weitere 19% der Sequenz bestehen aus Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften. In den funktionellen Bereichen ist die Konservierungsrate erwartungsgemäß deutlich höher. Im „Activation Loop“ stimmen 17 von 22 (77%), von der ATP-Bindungsstelle 19 von 23 (83%), von der Substratbindungsstelle 13 von 14 (93%) und von der Phosphorylierungsstelle alle Aminosäuren überein. Die substratspezifischen Docking-Sites sind dagegen nur in einem geringen Maß konserviert, hier stimmen 8 bzw. 4 von 13 Aminosäuren der orthologen Kinasen überein, wobei die Austausche durch ähnliche Aminosäuren erfolgten. Die Analyse erfolgte auf Grundlage einer NCBI-Blast-Analyse (<http://blast.ncbi.nlm.gov/Blast.cgi>).

3.2.2 Herstellung der *makb*- und *ste7*-Mutanten

Für die Charakterisierung von MAKB und STE7 wurden mehrere Mutanten hergestellt. Eine Übersicht der in diesem Teil der Arbeit hergestellten und verwendeten Mutanten mit ihrem jeweiligen Genotyp ist in der Tabelle 3.1 aufgeführt.

Herstellung der $\Delta ste7$ -Deletionsmutante

Die beiden „knock out“-Mutanten $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ wurden durch homologe Rekombination mit Hilfe von Ausschaltkassetten erzeugt. Die $\Delta makbAB$ -Mutante wurde von Ulrike Brandt angefertigt und stand zu Beginn dieser Arbeit bereits zur Verfügung. Die *ste7*-Ausschaltkassette wurde mittels YRC (Kap. 2.8.7) erzeugt. Sie besteht aus dem 5'-Bereich „upstream“ von *ste7*, aus *pyrG* als Selektionsmarker und dem 3'-Bereich „downstream“ von *ste7*. Die 992 bp lange 5'-Flanke wurde mit den Primern *ste7*-5'-Yeast-For und *ste7*-5'-*pyrG*-Rev, das 1360 bp große *pyrG*-Gen mit

Tab. 3.1: *Aspergillus niger*-Stämme

Name	Genotyp
AB1.13	<i>pyrG</i> ⁻
$\Delta makb$ AB	AB1.13 $\Delta makb::hph$
$\Delta makb$ AB_ <i>makb</i>	AB1.13 $\Delta makb::hph$; P _{<i>makb-makb</i>} -T _{<i>makb</i>} ; <i>pyrG</i> ⁺
$\Delta ste7$ AB	AB1.13 $\Delta ste7::pyrG$ ⁺
$\Delta ste7$ AB_ <i>ste7</i>	AB1.13 $\Delta ste7::pyrG$ ⁺ ; P _{<i>ste7-ste7</i>} -T _{<i>ste7</i>} ; <i>hph</i>
<i>ste7</i> daAB	AB1.13 <i>ste7</i> -S218D,T222D; <i>pyrG</i> ⁺

den Primern *pyrG-ste7-3'-For* und *pyrG-ste7-3'-Rev* sowie dem Plasmid pARAn37 als Template und die 942 bp lange 3'-Flanke mit den Primern *ste7-3'-pyrG-For* und *ste7-3'-Yeast-Rev* mit Hilfe der Phusion-DNA-Polymerase amplifiziert. Alle Fragmente wurden zusammen mit dem linearisierten Plasmid pRS426 in die Hefe FY834 transformiert. Nach der Isolierung des endgültigen Plasmids aus der Hefe wurde die 3229 bp lange Ausschaltkassette mit den Primern *ste7-5'-Yeast-For* und *ste7-3'-Yeast-Rev* amplifiziert. Die lineare Kassette wurde in AB1.13 transformiert, als Selektionsmarker diente die durch *PyrG* vermittelte Uridin-Prototrophie. Die Transformation brachte mehr als 50 primäre Transformanten hervor, von denen 24 mittels diagnostischer PCR auf homologe Integration der Ausschaltkassette getestet wurden. Die PCR erfolgte mit den Primern *ste7-Test-For* und *pyrG-Test-Rev*, sie erzeugte bei richtiger Integration der Kassette ein 1515 bp großes Amplifikat. Vier Transformanten, die die erwartete Bandengröße aufwiesen, wurden ausgewählt und es wurde überprüft, ob es zu unerwünschten, zusätzlichen heterologen Integrationen der Ausschaltkassette kam. Die Analyse erfolgte durch eine Southern Blot-Analyse, wozu genomische DNA der Primär-Transformanten mit *HindIII* verdaut wurde. Als Sonde für die Analyse diente die Ausschaltkassette (Abb. 3.16). Die Primär-Transformanten 6 und 11 wurden abschließend für die weitere Analyse ausgewählt und in $\Delta ste7$ AB (1 bzw. 2) umbenannt. Nach einer Einzelsporisolation wurde der homokaryotische Zustand der Transformanten mit den Primern *ste7-Test-For* und *Ste7-S218-T222D-Rev* überprüft und die Stämme in die Stammsammlung aufgenommen. Alle folgende Experimente wurden mit den Stamm

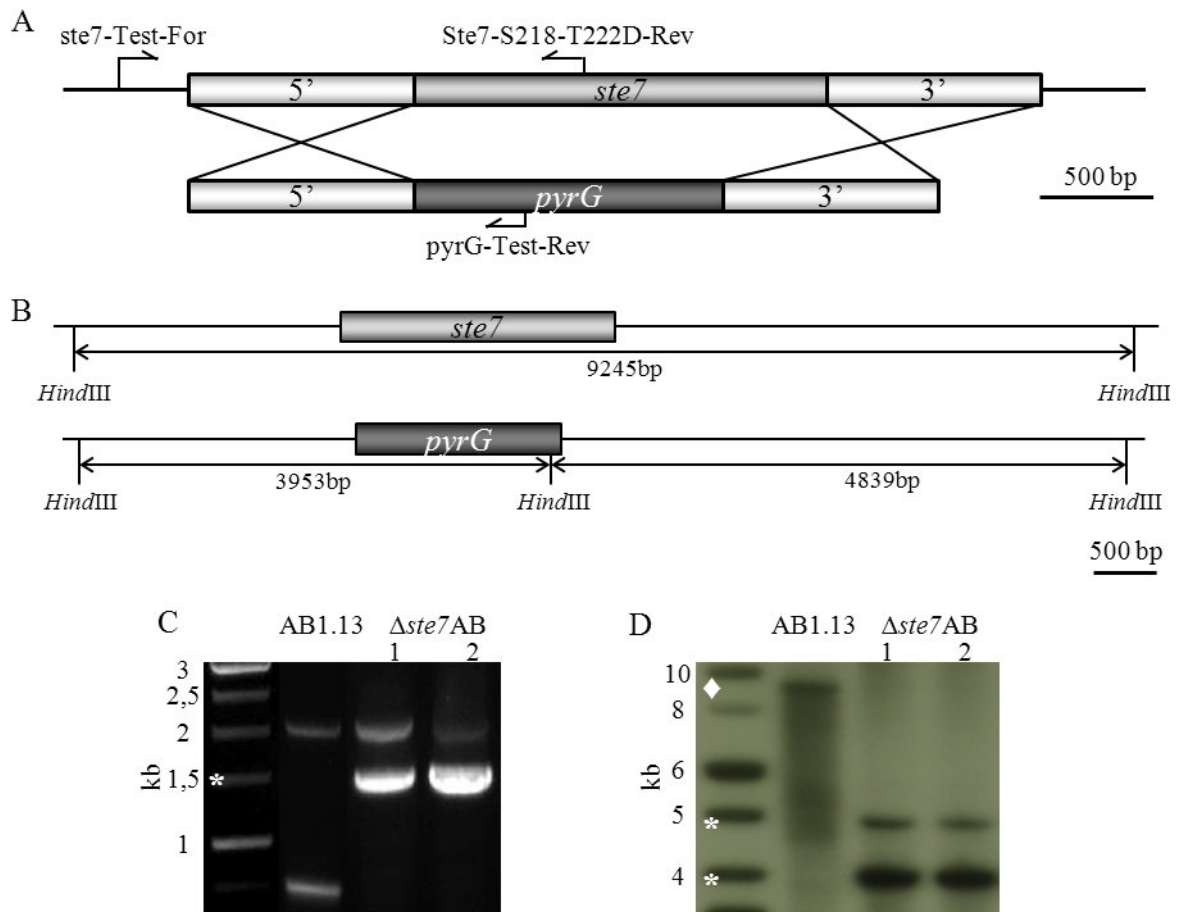


Abb. 3.16: Aufbau der *ste7*-Ausschaltkassette sowie Verifizierung der gewonnenen $\Delta ste7$ AB-Stämme. **A:** „Knock out“ von *ste7* durch homologe Rekombination mit der Ausschaltkassette. **B:** Schnittstellen für die genomische Southern Blot-Analyse. **C:** Integrationskontrolle der Ausschaltkassette durch PCR, es wird eine spezifische Bande von 1515 bp erwartet. **D:** Southern Blot, die Wildtyp-Bande wird bei 9,3 kb (Karo), die Banden der Ausschaltmutanten bei 4 bzw. 4,8 kb (Stern) erwartet.

$\Delta ste7$ AB (1) im Folgenden nur $\Delta ste7$ AB durchgeführt.

Komplementierung der $\Delta makb$ AB- und $\Delta ste7$ AB-Ausschaltmutanten

Wird ein Gen in einem Organismus deletiert, spiegelt sich dies oftmals in einer Veränderung des Phänotyps wieder. Die Komplementierung von Mutanten ist ein Verfahren, bei dem versucht wird, den ursprüngliche Zustand eines Organismus wiederherzustellen. Dabei wird die zuvor deletierte Gensequenz wieder in den Organismus eingebracht. Gelingt es dadurch den Ausgangszustand wieder herzustellen, gilt dies als sicherer Nachweis, dass der beobachtete Phänotyp durch die gewünschte Mutation verursacht wurde. Für die Komplementierung von $\Delta makb$ AB wurde *makb* einschließlich der Sequenz 1012 bp „upstream“ des Startcodons und 995 bp „downstream“ des Stoppcodons

dos von genomischer Wildtyp-DNA amplifiziert. Für die Isolierung des 3235 bp langen Fragments wurden die Primer makb-Komp-For und makb-Komp-Rev verwendet. Der Primer makb-Komp-For enthält eine *Mlu*I- und der Primer makb-Komp-Rev eine *Nde*I-Schnittstelle, mit denen eine Integration des Amplifikats in den verdauten Vektor pARAn37 möglich ist. Der Vektor enthält das *pyrG*-Gen zur Komplementierung der Uridin-Auxotrophie. Das fertige Konstrukt erhielt den Namen pUB0344.

Für die Komplementierung von $\Delta ste7AB$ wurde ebenso wie für die $\Delta makbAB$ -Komplementierung das *ste7*-Gen von genomischer Wildtyp-DNA, einschließlich des 1059 bp „upstream“-Bereichs vor dem *ste7* ATG und 1097 bp des „downstream“-Bereichs nach dem Stoppcodon amplifiziert. Der verwendete Forward-Primer *ste7*-Kmpl-For enthielt eine *Kpn*I-Schnittstelle und der Reverse-Primer *ste7*-Kmpl-Rev eine *Hind*III-Schnittstelle. Das Amplifikat ersetzte das Insert des Vektors pUB0276. Der Vektor basiert auf dem Plasmid pARAn37, wobei der Selektionsmarker *pyrG* durch das *hph*-Gen, das eine Hygromycin-Resistenz vermittelt, ersetzt wurde. Das fertige Plasmid erhielt die Bezeichnung pUB0339 (Abb. 3.17). Nach der Transformation in $\Delta ste7AB$ erfolgte die Selektion auf Hygromycin-haltigem Medium.

Von der Transformation von pUB0344 in $\Delta makbAB$ und pUB0339 in $\Delta ste7AB$ wurden jeweils 24 Transformanten vereinzelt und die Einzelsporen aufgereingt. Da sowohl $\Delta makbAB$ als auch $\Delta ste7AB$ bereits makroskopisch deutlich vom Wildtyp unterscheidbar sind (Kap.: 3.2.3), erfolgte im Anschluss eine optische Selektion auf positiv komplementierte Isolate, wobei das Hauptkriterium die Wiederherstellung des Wildtyp-

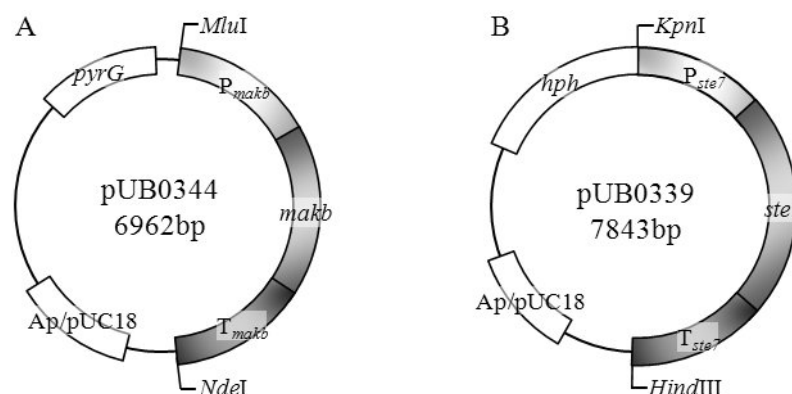


Abb. 3.17: Die Plasmide pUB0344 und pUB0339 wurden zur Komplementierung der Ausschaltmutanten erzeugt. Beide Plasmide wurden durch Ligation vom *makb* bzw. *ste7* inklusive des ca. 1 kb langen „upstream“ bzw. „downstream“-Bereichs des jeweiligen Gens in den Vektor pARAn37 erzeugt. In pUB0339 wurde außerdem das *pyrG*-Gen durch das *hph*-Gen ersetzt.

Phänotyps war. Jeweils zwei Stämme, die einen vollständigen Wildtyp-Phänotyp aufwiesen, wurden ausgewählt, bekamen die Bezeichnung $\Delta makbAB_makb$ (1 bzw. 2) respektive $\Delta ste7AB_ste7$ (1 bzw. 2) und wurden in die Stammsammlung aufgenommen.

3.2.3 Die $\Delta makb$ - und $\Delta ste7$ -Mutanten zeigen pleiotrope Veränderungen gegenüber dem Wildtyp

Für die Analyse wurde der Phänotyp von $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ morphologisch, qualitativ und quantitativ mit dem Wildtyp verglichen. Neben den Ausschaltmutanten wurde außerdem der Stamm $makb-gfpAB$ (Kap.: 3.2.7) sowie die komplementierten Ausschaltmutanten in die Analyse mit einbezogen. Die letzteren dienen dabei lediglich zur Bestätigung der Rekonstruktion des Wildtyp-Phänotyps durch Wiedereinbringen der MAP-Kinasen und somit zur Bestätigung der MAKB bzw. STE7 spezifischen Abhängigkeit der beobachteten Veränderungen. Der Stamm $makb-gfpAB$ enthält eine *gfp*-Erweiterung des *makb*-Gens am ursprünglichen Locus. Die Mutante wird in diesem Vergleich mit einbezogen, um Defekte, verursacht durch die C-terminale Erweiterung von MAKB, auszuschließen. Sie wird ab Kapitel 3.2.8 näher betrachtet.

Es wurden sieben Kriterien für die erste Charakterisierung der Ausschaltmutanten ausgewählt: Der optische Phänotyp, die Sporulationsrate, die morphologischen und physikochemischen Eigenschaften der Sporen, die Keimungsrate, die Wachstumsgeschwindigkeit der Hyphen sowie die Pelletmorphologie in Flüssigkultur.

Optischer Phänotyp - $\Delta makb$ und $\Delta ste7$ zeigen eine verzögerte Sporulation.

Im Vergleich zum Wildtyp auf Minimal-Medium zeigten bereits einige Primärtransformanten auf den Transformationsplatten ein deutlich helleres Erscheinungsbild. Um diesen Phänotyp quantitativ zu beschreiben, wurden radiär wachsende Kolonien der beiden Ausschaltmutanten, mit denen des Wildtyps, der komplementierten Stämme und von $makb-gfpAB$ verglichen. Für die Untersuchung wurden von allen Stämmen eine Sporensuspension aus frisch geernteten, filtrierten Sporen mit einer Konzentration von 10^7 Sporen pro ml angefertigt. Von jeder Suspension wurde ein 10 μ l Tropfen, also 10^5 Sporen, auf Minimal-Medium (Kap. 2.2.2) mit Uridin aufgebracht. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und einem 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus. Die Entwicklung der Kolonien wurde nach 48, 72 und 96 h dokumentiert.

Nach 48 Stunden waren der Wildtyp, die komplementierten und der *makb-gfpAB*-Stamm makroskopisch nicht voneinander unterscheidbar. In der Koloniemitte weisen sie alle eine deutliche Dunkelfärbung auf, was auf Sporenbildung hindeutet. Interessanterweise zeigen beide Ausschaltmutanten keinerlei Verfärbung und somit keinerlei Ansätze von Sporenbildung. Nach 72 Stunden bestätigen sich die vorangegangenen Beobachtungen für den Wildtyp und die mit ihm vergleichbaren Stämme. Im Gegensatz dazu weisen $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ nach 72 Stunden nun ebenfalls eine Dunkelfärbung auf, wenngleich diese deutlich geringer ausfällt als beim Wildtyp. Dies deutet auf das Einsetzen einer reduzierten Sporenbildung hin. Nach 96 Stunden stimmen das Erscheinungsbild der komplementierten und des *makb-gfpAB*-Stammes weiterhin mit dem des Wildtyps überein. Dagegen hat die Sporenbildung in den Ausschaltmutanten deutlich zugenommen, bleibt aber weiterhin erkennbar hinter denen des Wildtyps zurück

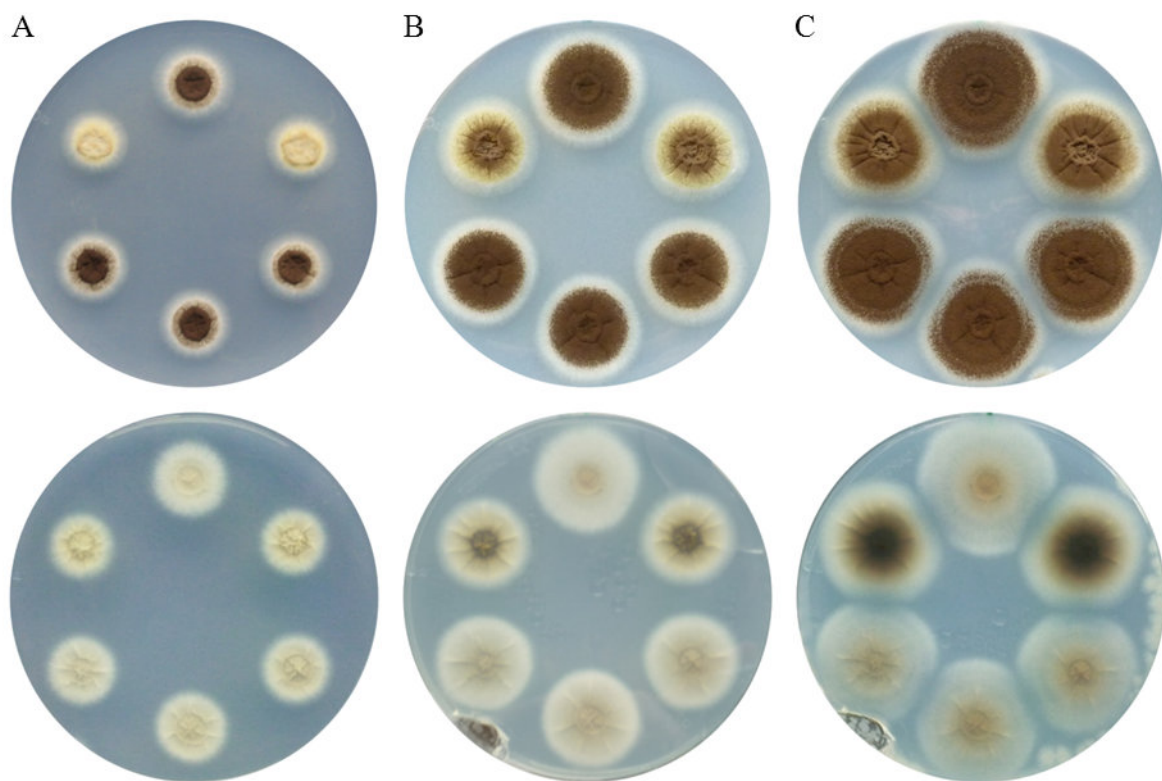


Abb. 3.18: $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ zeigen eine um 24 h verzögerte Sporenbildung. Kolonieentwicklung nach 48 h (A), 72 h (B) und 96 h (C) von Ober-(obere Reihe) und Unterseite (untere Reihe) betrachtet. Im Uhrzeigersinn, beginnend bei 12 Uhr sind, die Stämme AB1.13 (Wildtyp), $\Delta makbAB$, $\Delta makbAB_makb$, AB1.13.*makb-gfp*, $\Delta ste7AB_ste7$ und $\Delta ste7AB$ aufgetragen. Für die Dokumentation der Unterseite wurde die Platte gespiegelt beimpft, sodass die Reihenfolge der Kolonien in der Abbildung mit der der Oberseite übereinstimmt.

(Abb. 3.18). Betrachtet man zusätzlich das Kulturmedium auf denen die Kolonien wachsen, ist bei $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ eine parallel zur Sporenbildung einsetzende Dunkelfärbung des Mediums erkennbar. Im Gegensatz dazu ist zu keinem Zeitpunkt eine Verfärbung im Medium unterhalb des Wildtyps, der komplementierten Mutanten oder von *makb-gfpAB* erkennbar (Abb. 3.18 Unterseite).

Die Deletion von *makb* oder *ste7* bewirkt eine verzögerte Konidiophorenentwicklung.

Die bisherigen Beobachtungen deuten auf Verzögerungen in der Entwicklung, vor allem auf ein verzögertes Einsetzen der Sporenbildung in den Ausschaltmutanten hin. Die Ursache für diesen Defekt ist unbekannt. Aus diesem Grund soll dieser Phänotyp im Folgenden genauer untersucht werden. Bei der Sporulation handelt es sich um einen hoch regulierten Ablauf, bei dem viele Prozesse aufeinander aufbauen. Die einzelnen Stadien sind dabei durch, z.T. deutliche, morphologische Änderungen klar voneinander unterscheidbar (Kap. 1.2.1). Es ist daher sinnvoll, eine zeitliche Analyse der Sporulation vom Wildtyp und den Mutanten anzufertigen, mit deren Hilfe anschließend eine zeitliche sowie funktionelle Einordnung der Aufgabe der MAKB-Signalkaskade erfolgen kann.

Während des radialen Koloniewachstums kommt es zu einem kontinuierlichen Hyphenwachstum an den Kolonierändern. Aus diesem Grund bietet diese Wachstumsform den Vorteil, dass sie ab einem bestimmten Koloniealter alle Stadien der Entwicklung von *A. niger*, von jungen Hyphen bis hin zu Konidiophoren, enthalten. Das Auftreten einzelner morphologischer Veränderungen im Verhältnis zur Wachstumsfront lässt sich dabei bestimmten Zeitabständen zuordnen und ermöglicht somit eine chronologische Dokumentation der Veränderungen in den Mutanten gegenüber dem Wildtyp. Ist die Konidiophor-Bildung in den Mutanten verzögert, wird dies durch einen vergrößerten Abstand der Konidiophore zur Wachstumsfront erkennbar.

Die Umsetzung des Versuchs erfolgte auf Minimal-Medium unter Standardbedingungen (Kap. 2.1.1). Das Festmedium wurde mittig mit einem 5 μ l Tropfen (entspricht 5×10^5 Sporen) AB1.13, $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ beimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und einem Tag-Nacht-Rhythmus für 3 Tage. Anschließend wurde die Entwicklung der entstandenen Kolonien mit Hilfe des Binokulars in einem Winkel von 60° und zwei-

facher Vergrößerung mikroskopisch dokumentiert. Bei dieser Vergrößerung war zum einen gewährleistet, dass kleine Strukturen ausreichend gut aufgelöst wurden, zum anderen war die Erfassung aller Entwicklungsstufen in einem Bildausschnitt möglich. Da die Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen Stämme, sowie die Abmessungen der Bildausschnitte bekannt sind, war es möglich, das Auftreten der einzelnen morphologischen Änderungen zeitlich, in Abhängigkeit zur Myzelfront, anzugeben.

Das Myzel von AB1.13 beginnt nach sieben Stunden mit der Lufthyphenbildung (Abb. 3.19). Nach sieben weiteren Stunden sind die ersten, kleinen Vesikel erkennbar, die sich in den nächsten fünf Stunden zu vollständigen Konidiophoren entwickeln. In ihrer Gesamtheit bilden die Konidiophore dabei eine Front, die parallel zum Myzelrand verläuft. Die Konidiophore vergrößern sich mit jeder weiteren Stunde, bis sie ihre Endgröße erreichen und das Pilzmyzel nahezu vollständig bedecken.

In $\Delta makbAB$ wie auch in $\Delta ste7AB$ sind die ersten Lufthyphen erst nach 10 Stunden, also drei Stunden später als in AB1.13, erkennbar. Die ersten Konidiophore zeigen sich nach 22 Stunden, von den Lufthyphen ausgehend fünf Stunden später als im Wildtyp. Die Sporenköpfe bilden sich deutlich verstreuter, sodass keine klare Front wie beim Wildtyp erkennbar ist. Darüber hinaus bleiben die Konidiophore deutlich kleiner. In

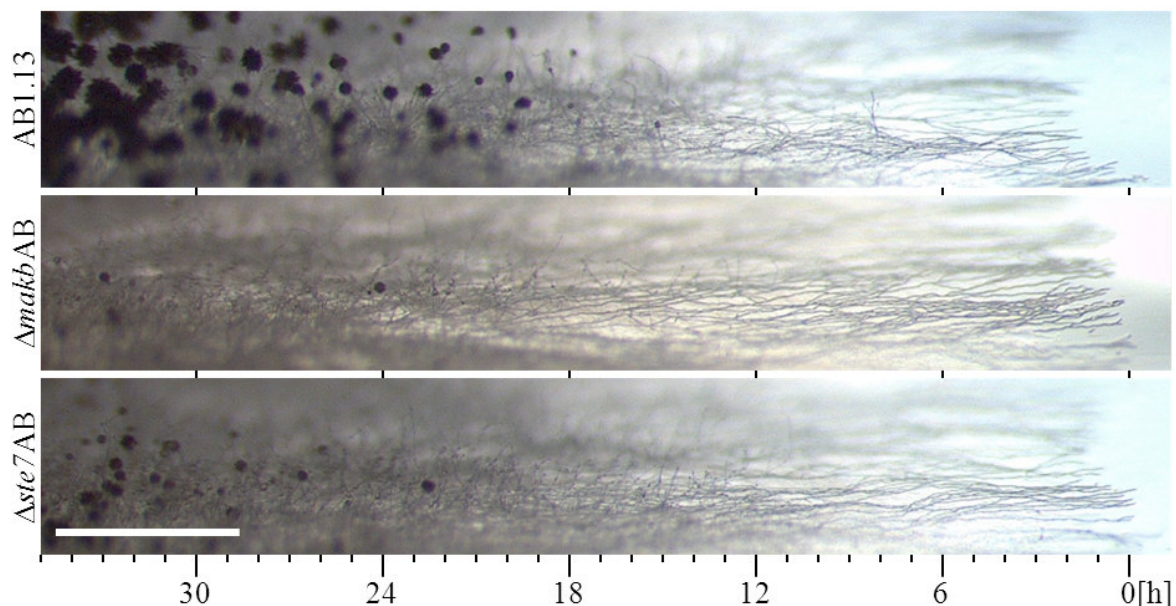


Abb. 3.19: $\Delta makbAB$ wie auch $\Delta ste7AB$ zeigen eine verzögerte und verminderte Konidiophorentwicklung. Die Aufnahmen stellen drei Tage alte, radial wachsende Pilzkulturen dar. Sie wurden seitlich in einem Winkel von 60° bei zweifacher Vergrößerung aufgenommen. Größenstandard: 1 mm.

Bereichen die deutlich älter als 48 Stunden sind, ist sowohl im Wildtyp als auch in den Ausschaltmutanten keine Veränderung mehr erkennbar. Betrachtet man diese Zeitpunkte, ist feststellbar, dass die Defizite nicht kompensiert werden. Folglich weisen die Ausschaltmutanten eine allgemein verzögerte Differenzierung sowie eine verschlechterte Konidiophor- bzw. Konidienbildung auf. Aus diesem Grund kann vermutet werden, dass der Signalweg an der Einleitung und effektiven Ausführung der Sporulation beteiligt ist.

Sporulation - $\Delta makb$ und $\Delta ste7$ weisen eine geringere Sporulationsrate als der Wildtyp auf.

Die Beobachtungen des optischen Phänotyps lassen bereits eine deutlich reduzierte Effektivität der MAP-Kinase-Mutanten, Konidien zu bilden, vermuten. Daher soll im Folgenden die Sporulationsrate aller sechs Stämme quantifiziert werden.

Die klassischen Sporen-Quantifizierungsmethode (Kap. 2.3.1) erwies sich dabei für die Bestimmung der Konidienmenge der Mutante als ungeeignet.

Aus diesem Grund wurde eine alternative Quantifizierungsmethode etabliert, bei der radial wachsende *A. niger*-Kolonien verwendet wurden. Die Analyse erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten, dabei wurde jeweils der Durchmesser der Kolonie zur Flächenberechnung bestimmt und im Anschluss die gesamte Kolonie zur Quantifizierung der Sporenzahl verwendet. Die Angabe der Sporen erfolgte abschließend in Sporen pro cm^2 . Für den Versuch wurden Minimal-Medium Platten mit 20 μl Sporensuspension angeimpft und bei 37°C inkubiert. Nach 48, 72 und 96 h wurden jeweils die gesamten Kolonien zur Ermittlung der Sporen pro cm^2 vermessen und quantifiziert.

Entsprechend den Erwartungen auf Grundlage der vorangegangenen Experimente konnte kein Unterschied in der Konidienbildung zwischen dem Wildtyp, den komplementierten Mutanten und *makb-gfpAB* festgestellt werden. Dagegen war die Sporenmenge von $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ nach 48 Stunden auf 3% der Wildtyp-Konidienmenge reduziert. Interessanterweise war das Verhältnis der gebildeten Konidien zwischen den Stämmen nicht konstant. So stieg die Sporenmenge der Ausschaltmutanten nach 72 Stunden auf $13 \pm 1,5\%$ und nach 96 Stunden auf $30 \pm 3\%$ der Wildtyp-Sporenmenge,

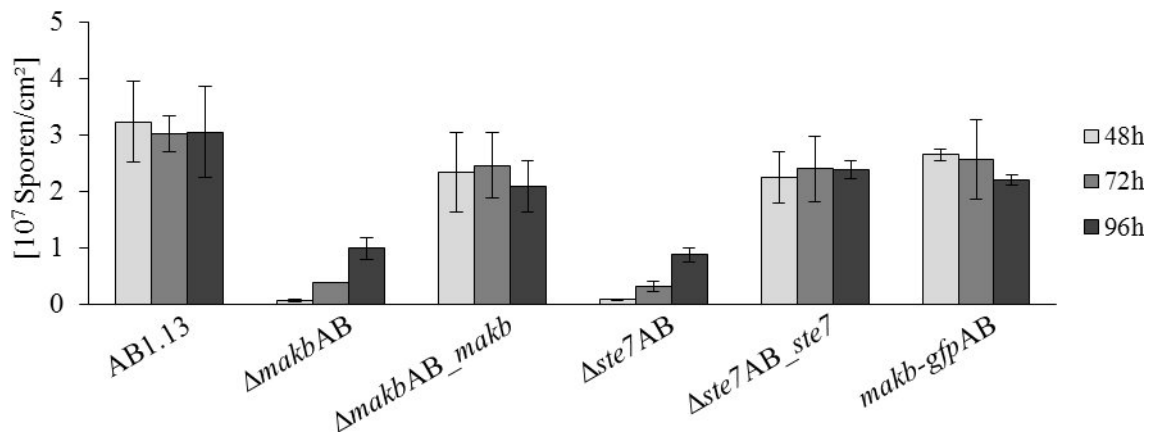


Abb. 3.20: $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ weisen Sporulationsdefizite auf. Auf der y-Achse ist die ermittelte Sporenzahl pro cm^2 , auf der x-Achse sind die verwendeten Stämme sowie die jeweiligen Messergebnisse nach 48, 72 und 96 h dargestellt.

wohingegen diese über den gesamten Versuchszeitraum konstant bei 3×10^7 Sporen pro cm^2 blieb (Abb. 3.20). Obwohl sich die Sporenmengen des Wildtyps und der Ausschaltmutanten im Laufe des Experiments angleichen, erreichten die Konidienmengen der Ausschaltmutanten nie das Wildtyp-Niveau. Somit kann eine Kolonialeter-abhängige Beteiligung von MAKb und STE7 an der Konidienbildung vermutet werden.

Die Sporenoberfläche von $\Delta makbAB$

Die ersten Untersuchungen offenbarten eine reduzierte Sporenbildung und ein verändertes Erscheinungsbild der sporulierenden Kultur von $\Delta makbAB$ (Abb. 3.18). Im Folgenden sollte die Qualität und das äußere Erscheinungsbild der Sporen untersucht werden. Eines der zu analysierenden Merkmale ist die Oberflächenstruktur der $\Delta makbAB$ -Sporen sowie ihr Vergleich mit der Struktur von AB1.13-Sporen. Für die Analyse möglicher morphologischer Veränderungen der Sporenoberfläche wurden REM-Aufnahmen vom $\Delta makbAB$ - und AB1.13-Sporen angefertigt. Es wurden vier Tage alte Sporen mit Wattestäbchen trocken geerntet und auf die Klebefläche von Pins übertragen. Die Sporen wurden im Anschluss mit Gold bedeckt und ohne weitere Behandlungen mikroskopiert.

Die entstandenen Aufnahmen offenbarten keinerlei Unterschiede in der Oberflächenstruktur zwischen reifen AB1.13- und $\Delta makbAB$ -Sporen (Abb. 3.21). Es konnte allerdings eine deutlich erhöhte Anzahl an unreifen, glatten Sporen in den $\Delta makbAB$ -Proben festgestellt werden, welche die zeitliche Verzögerung in der Sporenentwicklung

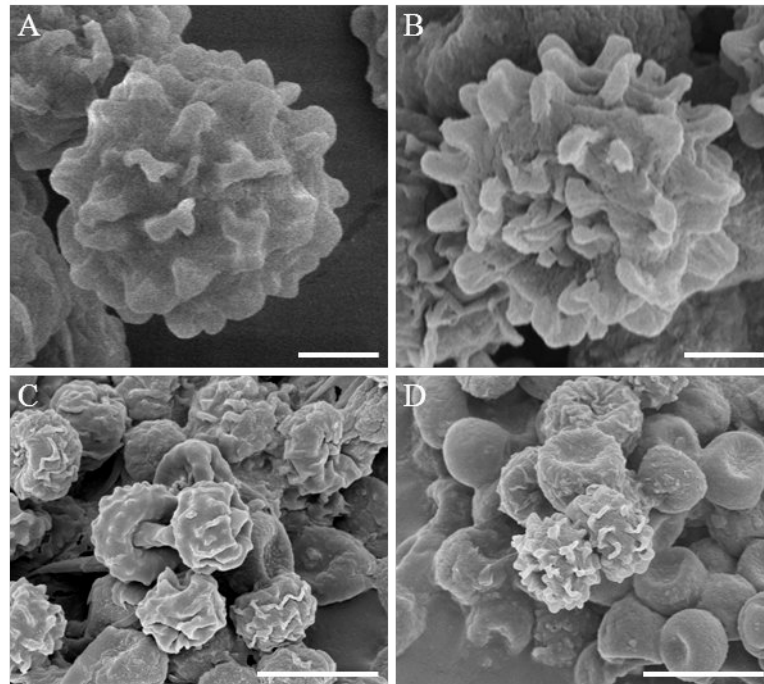


Abb. 3.21: REM Aufnahmen offenbaren keine Veränderung der Sporenoberfläche von $\Delta makbAB$ gegenüber AB1.13. Für die Untersuchung wurden vier Tage alte Sporen verwendet (A,C: AB1.13; B,D: $\Delta makbAB$). Obwohl die Sporenoberflächen reifer Sporen nicht unterscheidbar sind, war eine höhere Zahl an unreifen Sporen mit einer glatten Oberfläche bei der Sporenanalyse der Ausschaltmutante auffällig. Größenstandard: A,B: 1 μm , C,D: 5 μm .

der $\Delta makbAB$ -Mutante zusätzlich bestätigte (Abb. 3.21 C und D).

Die hydrophoben Eigenschaften von $\Delta makbAB$ -Sporen weisen keine Veränderung gegenüber dem Wildtyp auf.

Der Knock out von *makb*-Orthologen in anderen Pilzen hat zum Teil eine erhebliche Änderung der hydrophoben Eigenschaften der Sporen zur Folge (Mukherjee *et al.* 2003). Aus diesem Grund wird der Einfluss von MAKB auf die hydrophoben Eigenschaften von Sporen untersucht. Für die Untersuchung wurde die Analyse des Höhe-zu-Breite-Verhältnisses eines Wassertropfens auf vollständig sporulierten Oberflächen gewählt. Der Versuch erfolgt analog der im Kapitel 3.1.6 beschriebenen Durchführung.

Die Auswertung zeigt, dass sich das Höhe-zu-Breite-Verhältnis der Wassertropfen auf sporulierten AB1.13 und $\Delta makbAB$ Kolonien nicht unterschied. In beiden Fällen beträgt es 1,44 zu 1 (Abb. 3.22). Demnach hat der Verlust der Kinase *makb* keinen Einfluss auf die Hydrophobizität der Oberfläche von *A. niger* Sporen.

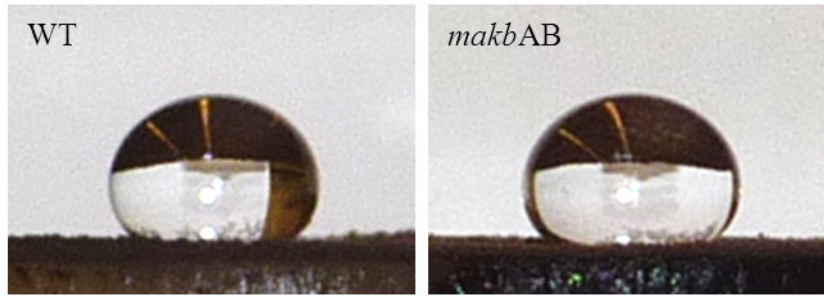


Abb. 3.22: Die Sporenoberfläche von AB1.13- und $\Delta makbAB$ -Sporen weisen die gleichen hydrophoben Eigenschaften auf. Für die Analyse der Hydrophobizität wurde ein 50 μ l Wassertropfen auf die vollständig sporulierten Kulturen gegeben.

Die Keimung von $\Delta makbAB$ - und $\Delta ste7AB$ -Sporen ist verlangsamt.

Abgesehen von der verzögerten Sporenbildung sowie dem späteren Vorliegen reifer Konidien wurden keine Auffälligkeiten bei den Sporen von $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ festgestellt. Dennoch stellt sich die Frage, inwiefern sich die Unterbrechung des Signalwegs auf die Keim- und Lebensfähigkeit der Sporen auswirkt. Um dies zu testen, wurden Sporen von vier und acht Tage alten Kolonien in Suspension aufgenommen. Anschließend wurden die Suspensionen stark verdünnt und Tropfen aller Stämme auf jeweils eine Platte mit Minimal-Medium ausgebracht, sodass Keimungsunterschiede aufgrund von Medieneinflüssen ausgeschlossen werden konnten. Die Platten wurden bei 37°C inkubiert. Nach sechs bzw. acht Stunden wurden mikroskopisch Zufallsbilder von den Konidien bzw. Keimlingen angefertigt.

Die Auswertung ergab einen deutlichen Unterschied zwischen der Keimfähigkeit der AB1.13- und der $\Delta makbAB$ - bzw. $\Delta ste7AB$ -Sporen. So waren nach sechs Stunden $83 \pm 3\%$ der Wildtyp-, aber nur $16 \pm 9\%$ der $\Delta makbAB$ - bzw. $10 \pm 4\%$ $\Delta ste7AB$ -Sporen gekeimt. Die komplementierten Ausschaltmutanten wie auch der *makb-gfpAB*-Stamm zeigten keine Beeinträchtigungen der Keimfähigkeit (Abb. 3.23). Bei der zweiten Quantifizierung der Sporenkeimung nach acht Stunden waren $85 \pm 3\%$ der $\Delta makbAB$ - und $84 \pm 5\%$ der $\Delta ste7AB$ -Sporen gekeimt, was dem Wildtyp-Niveau nach sechs Stunden entspricht. Die Unterbrechung des *makb*-Signalweges hat demnach eine Verzögerung der Konidienkeimung zur Folge.

Ein Unterschied zwischen der Keimfähigkeit der Sporen von vier und acht Tage alten Kolonien konnte nicht festgestellt werden. Folglich kann ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Keimungsverzögerung der Ausschaltmutanten auf unreife Sporen

zurückzuführen ist. Außerdem zeigte sich, dass die Sporen keine Beeinträchtigung in ihrer allgemeinen Lebensfähigkeit haben, da, unabhängig von der Zeit, vergleichbare Sporenmengen keimten.

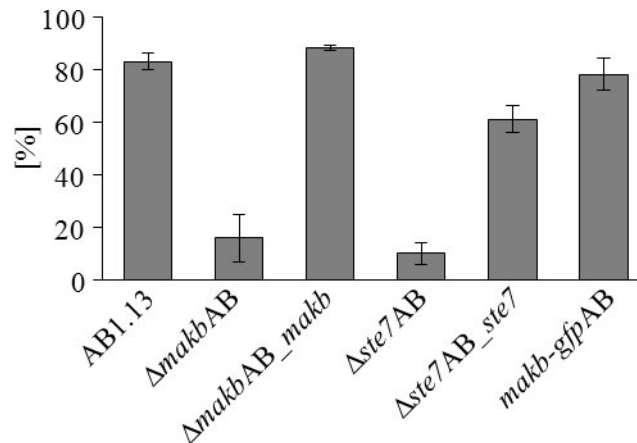


Abb. 3.23: $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ weisen ein verminderte Sporenkeimung nach sechs Stunden Inkubation auf. Die y-Achse stellt die relative Häufigkeit von gekeimten Sporen nach sechs Stunden in Prozent dar.

Hyphen von $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ weisen eine signifikant geringere Wachstumsgeschwindigkeit auf.

Aus dem makroskopischen Erscheinungsbild (Abb. 3.18) sowie der verzögerten Keimfähigkeit der Ausschaltmutanten ergibt sich die Frage, ob nur der letztere oder auch andere Prozesse von *A. niger*, wie die Hyphenwachstumsgeschwindigkeit, verlangsamt ablaufen. Aus diesem Grund wurde die Geschwindigkeit des Hyphenwachstums von AB1.13, $\Delta makbAB$, $\Delta ste7AB$, den komplementierten Mutanten und *makb-gfpAB* ermittelt. Zur Bestimmung der Wachstumsrate wurden radiär wachsende Kolonien analysiert. Hierzu wurden Sporensuspensionen auf 10^7 Sporen pro ml eingestellt, Minimal-Medium Platten mittig mit 20 μ l der Suspension beimpft und bei 37°C inkubiert. Der Referenzpunkt wurde nach 48 h, das Wachstum ab diesen Zeitpunkt entlang der Zentralen alle 24 h markiert (Kap. 2.3.3).

Bei der Quantifizierung konnte eine 10% Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit der Myzelfront von $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ gegenüber allen Vergleichsstämmen gemessen werden. Ein Einfluss der Keimungsverzögerung wurde durch eine 48 stündige Inkubation der Kolonien vor Festlegung des Startpunktes ausgeschlossen (Abb. 3.24).

Der MAKB MAP-Kinaseweg beeinflusst somit nicht nur den Keimungszeitpunkt der Konidien, sondern ist auch in den allgemeinen Wachstumsprozessen von *A. niger*-Hyphen involviert.

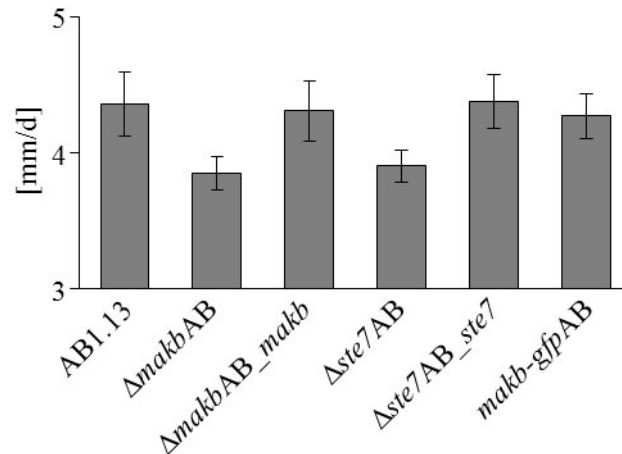


Abb. 3.24: $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ zeigen ein um 10% ($0,4 \text{ mm/d} \pm 0,1 \text{ mm}$) reduziertes Hyphenwachstum gegenüber AB1.13. Die y-Achse stellt die Wachstumsgeschwindigkeit in mm pro Tag da. Die Skala ist auf den Bereich von drei bis 5 mm verkürzt.

Die Deletion von *makb* und *ste7* hat keine Auswirkungen auf die Fähigkeit zur Hyphenfusion.

Hyphen von *A. niger* sind in der Lage, miteinander zu fusionieren und somit ein Netzwerk aus miteinander verbundenen Kompartimenten zu bilden. In einigen filamentösen Pilzen konnte eine Beteiligung der MAKB-orthologen Kinase an diesen Fusionsereignissen nachgewiesen werden. Dagegen ist in *A. niger* der Prozess der Hyphenfusion bisher nicht beschrieben. Die Fusionsereignisse finden wahrscheinlich vor allem in älteren Bereichen von Kolonien statt, in denen die Hyphen vielschichtig übereinander liegen und somit eine Analyse erschweren. Aus diesem Grund erfolgte auch keine quantitative Analyse der Fusionshäufigkeit der Mutanten, sondern nur eine Überprüfung, ob $\Delta makbAB$ bzw. $\Delta ste7AB$ überhaupt noch in der Lage sind zu fusionieren.

Der Grundgedanke des Versuchs beruht auf der Bildung von Heterokaryen. Beide homokaryotischen Fusionspartner können dabei einen für das Wachstum essentielle Selektionsfaktor, in diesem Fall ist dies die Hygromycin-Resistenz bzw. die Uridin-Prototrophie, synthetisieren. Die fusionierten Myzele der beiden Stämme können dem-

nach auf Hygromycin-haltigem Medium ohne Uridin wachsen, die homokaryotischen Ausgangsstämme dagegen nicht.

Für den Versuch wurde die Stämme $\Delta alb1AB$, *makb-gfpAB*, $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ verwendet. $\Delta alb1AB$ und $\Delta makbAB$ sind Hygromycin-resistent, benötigen aber Uridin zum Wachsen und *makb-gfpAB* und $\Delta ste7AB$ sind Uridin-Prototroph und Hygromycin-sensitiv. Die Stämme $\Delta alb1AB$ und *makb-gfpAB* können im Bezug auf Fusionsfragen als Wildtyp-Stämme angesehen werden.

Zur Gewinnung von Biomasse wurden Flüssigkulturen unter idealen Wachstumsbedingungen mit Sporen der jeweiligen Stämme beimpft. Im Anschluss wurde das Myzel der unterschiedlichen Stämme einzeln, mit dem jeweiligen Fusionspartner vermischt und auf Minimal-Medium mit 200 µg/ml Hygromycin übertragen. Nach drei Tagen Inkubation zeigten alle Ansätze ein vergleichbares, deutliches Wachstum (Abb. 3.25). Die homokaryotischen Myzelproben wiesen dagegen nur ein sehr geringes Wachstum von 1-2 mm auf, welches auf eine Restaktivität der Hyphen aufgrund der Nährstoffe aus der Flüssigkultur zurückgeführt werden kann.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Unterbrechung des MAKB-Signalwegs keinen vollständigen Verlust der Fähigkeit zur Hyphenfusion in *A. niger* zur Folge hat. Eine Aussage über die Häufigkeit und Effizienz der Fusionen in den Mutante ist allerdings nicht möglich.

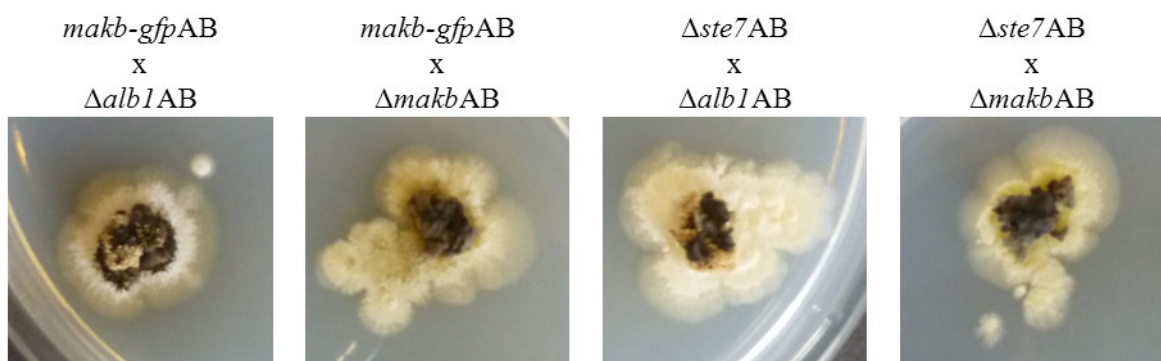


Abb. 3.25: Es sind keine Unterschiede in der Fähigkeit zur Hyphenfusion zwischen Wildtyp und $\Delta makbAB$ bzw. $\Delta ste7AB$ erkennbar. Dargestellt ist das Hyphenwachstum der angegebenen Fusionspartner auf Selektionsmedium nach drei Tagen Inkubation.

Die Pelletmorphologien von AB1.13, $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ unterscheiden sich nicht.

Ein Grund für die Herstellung und Analyse von $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ waren die Beschreibungen von einem apolaren Hyphenwachstum im Zusammenhang mit der Unterbrechung von MAK-Kinase-Signalwegen in *A. niger* (Bruno *et al.* 2009). Solche morphologischen Veränderungen sind vor allem für biotechnologische Anwendungen von Bedeutung, da sie einen erheblichen Einfluss auf die Sekretion von Metaboliten haben können.

Die Auswirkungen der Ausschaltung der Kinasen auf die Pelletbildung von *A. niger* wurde daher in Flüssigmedium zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert. Für die Untersuchung wurden 10^7 Sporen/ml von AB1.13 bzw. von den Ausschaltmutanten in 50 ml Minimal-Medium bei 37°C und 80 UpM inkubiert. Die Morphologie der Pellets wurde regelmäßig dokumentiert, wobei ein besonderer Fokus auf deren Randbereich gelegt wurde, aus denen kontinuierlich junge Hyphen herauswachsen. Bei den mikroskopischen Untersuchungen konnten dabei zu keinem Zeitpunkt reproduzierbare Unterschiede zwischen der Morphologie der AB1.13- und den $\Delta makbAB$ - bzw. $\Delta ste7AB$ -Pellets festgestellt werden (Abb. 3.26).

Somit sind die Kinasen MAKB und STE7 in *A. niger* wahrscheinlich nicht an morphologischen Entwicklungsprozessen in Flüssigkultur beteiligt.

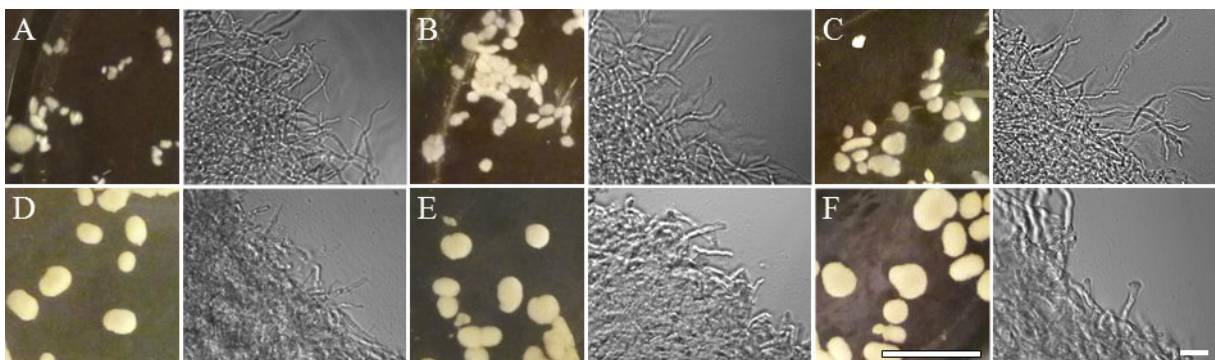


Abb. 3.26: Die Pelletmorphologie von AB1.13, $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ unterscheidet sich zu keinem Zeitpunkt. Die Aufnahmen erfolgten 24 (A-C) und 48 Stunden (D-F) nach Inkubationsbeginn. A, D: AB1.13, B, E: $\Delta makbAB$ und C, F: $\Delta ste7AB$. Sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch sind keine Unterschiede in Erscheinungsbild zwischen den Stämmen erkennbar. Größenstandard: Makroskopisch 1 cm, Mikroskopisch 25 μ m.

3.2.4 Nährstoff- und Zelldichte-abhängige Induktion der Sporenbildung

Die Ergebnisse der vorangegangenen Kapitel haben gezeigt, dass sich die Deletion von *makb* bzw. *ste7* vor allem auf die Sporulation auswirkt. Dabei wurde kein vollständiger Verlust, sondern eine Verminderung und eine Verzögerung der Sporenbildung beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass der *makb*-Signalweg an der Sporenbildung beteiligt ist, selbst aber keinen essentiellen Bestandteil der Sporulation darstellt.

Es ist bekannt, dass die Sporenbildung in Pilzen durch verschiedene Faktoren eingeleitet werden kann. So fördert u.a. Stickstoffmangel die Konidienbildung in *N. crassa* (Schmit und Brody 1976, Gimeno *et al.* 1992). In *A. nidulans* führt Nährstoffmangel zur Expression des *brlA*-Gens. BrlA induziert und reguliert als Transkriptionsfaktor die Konidienbildung nicht nur in *A. nidulans* sondern z.B. auch in *A. oryzae* (Skromne *et al.* 1995, Chang und Timberlake 1993).

In Kolonien mit einer ausreichenden Nährstoffversorgung wird die Konidienbildung dagegen beim Erreichen einer bestimmten Myzeldichte induziert. In *A. flavus*, *A. parasiticus* und *A. nidulans* wurden Linolsäure und deren Derivate als wichtige Bestandteile dieses Prozesses identifiziert. Die Säuren werden dabei von den Hyphen kontinuierlich sekretiert und können von Rezeptoren auf der Oberfläche der Hyphen wahrgenommen werden. Mit steigender Myzeldichte erhöht sich die Konzentration der Säuren, wodurch es ab dem Erreichen einer bestimmten Grenzkonzentration zur Aktivierung einer Signalkaskade und dadurch zur Induktion der Konidiogenese kommt (Brown *et al.* 2009, Calvo *et al.* 2002).

Es kann daher davon ausgegangen werden, dass mindestens zwei Signalwege für die Induktion der Sporenbildung in *A. niger* existieren, wobei ein Signalweg durch Hunger, der andere durch die Myzeldichte aktiviert wird. Wir gehen davon aus, dass MAKB an einem dieser Signalwege beteiligt ist, aus diesem Grund sollten im Folgenden unterschiedliche Hypothesen zum Beitrag von MAKB an der Sporenbildung in *A. niger* getestet werden.

I. MAKB wird durch Nährstoffmangel aktiviert.

Hypothese: Die MAP-Kinase MAKB ist an der Wahrnehmung der zur Verfügung stehenden Nährstoffmenge beteiligt. Bei dieser Hypothese wird angenommen, dass die

Sporulation in *A. niger* durch MAKB bei Nährstoffmangel induziert wird.

Experiment: Für die Untersuchung der Hypothese bieten sich zum einen radial wachsende Kolonien auf Festmedium mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen an. Der Abstand zwischen Konidiophor- und Wachstumsfront dient dabei als Maß zur Bestimmung einer zeitlichen Veränderung der Induktion der Konidienbildung.

Ebenfalls geeignet für die Untersuchung der Fragestellung ist synchronisiertes Myzel. Da die Sporenbildung bei dieser Kultivierungsform nicht kontinuierlich in einzelnen Bereichen des Myzels, sondern zeitgleich in der gesamten Kolonie erfolgt, ist das Einsetzen der Sporenbildung besonders deutlich erkennbar. Eine zeitliche Veränderung wird entsprechend nicht durch die Analyse einer einzelnen Kolonie, sondern durch den Vergleich zweier Kulturen auf Medium mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen sichtbar.

Erwartung: Trifft die Hypothese zu, sollte der Wildtyp bei schlechter Nährstoffversorgung die Konidienbildung früher induzieren als auf Medium mit einer hohen Nährstoffkonzentration. Da die $\Delta makbAB$ bzw. $\Delta ste7AB$ -Mutanten entsprechend der Hypothese die Nährstoffkonzentration nicht wahrnehmen können, sollte die Induktion der Sporenbildung ausschließlich von der Myzeldichte abhängen und somit unabhängig von der Nährstoffkonzentration auf allen Medien zu vergleichbaren Zeiten einsetzen.

II. MAKB wird beim Erreichen einer bestimmten Myzeldichte aktiviert.

Hypothese: Die MAP-Kinase MAKB ist an der Wahrnehmung der Myzeldichte beteiligt. Bei dieser Hypothese wird angenommen, dass der *makb*-Signalweg in *A. niger* beim Erreichen einer definierten Myzeldichte aktiviert wird und anschließend die Induktion der Sporenbildung erfolgt.

Experiment: Für die Untersuchung der Hypothese bieten sich die gleichen Experimentellen Ansätze wie bei der ersten Hypothese an.

Erwartung: Ist MAKB an der Wahrnehmung der Myzeldichte beteiligt, sollte die Sporenbildung im Wildtyp, unabhängig von der Nährstoffversorgung, bei allen Ansätzen mit dem Erreichen der Myzel-Grenzdichte einsetzen. Dies sollte, abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit bei den unterschiedlichen Nährstoffbedingungen, relativ synchron erfolgen. Die Ausschaltmutanten können, entsprechend der Hypothese, die Myzeldichte nicht wahrnehmen. Die Sporenbildung sollte folglich ausschließlich durch

Nährstoff-mangel induziert werden. Daher wird erwartet, dass die Konidienbildung in den Ausschaltmutanten mit steigender Glukosekonzentration zunehmend verzögert erfolgt bzw. vollständig unterdrückt wird.

III. In den Ausschaltmutanten ist die Sporulation unabhängig von der Nährstoffversorgung und der Myzeldichte beeinträchtigt.

Hypothese: MAKB ist weder an der Erkennung von Nährstoffen noch an der Wahrnehmung der Myzeldichte beteiligt. Die MAP-Kinase übernimmt stattdessen andere, unbekannte regulatorische Funktionen, sodass die Unterbrechung des MAKB-Signalweges in *A. niger* aufgrund von Sekundäreffekten zu einer allgemein verzögerten und verminderten Sporenbildung führt.

Experiment: Für die Überprüfung der Hypothese können die gleichen Experimente wie für die anderen Hypothesen verwendet werden.

Erwartung: Ist MAKB weder an der Myzeldichteerkennung noch an der Nährstoffwahrnehmung beteiligt, sollte die Sporenbildung in den Mutanten immer in gleicher Weise verzögert zum Wildtyp einsetzen. Bei der Auswertung dürfen dabei immer nur Kulturen auf Medium mit identischen Nährstoffbedingungen miteinander verglichen werden.

Für die Untersuchung der Hypothesen wurden zwei verschiedene Ansätze verwendet. Im Folgenden werden daher zuerst Durchführung und Ergebnisse der Auswertung von radial wachsenden Kolonien und im Anschluss das synchronisierte Myzelwachstum beschrieben.

Für beide Versuchsreihen wurden Minimal-Medium-Platten mit Glukosekonzentrationen zwischen 0,0125 und 3,2 M hergestellt, wobei die Menge an Glukose von einer Konzentrationsstufe zur nächst höheren jeweils verdoppelt wurde.

Für die Analyse der Konidiophorentwicklung radial wachsender Kolonien wurden die Platten mittig mit 20 µl einer Suspension aus 10^7 Sporen pro ml angeimpft und bei 37°C unter einem 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach 96 h optisch, sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch.

AB1.13 wies dabei unabhängig von der Glukosekonzentration einen relativ konstanten Abstand zwischen der Myzel- und der Sporulationsfront auf und auch die Sporula-

tion selbst setzte unabhängig von der Glukosekonzentration zu vergleichbaren Zeiten ein (Abb. 3.27 A). Dagegen vergrößerte sich bei den Mutanten der Abstand zwischen der Myzel- und der Sporulationsfront mit steigender Glukosekonzentration deutlich. Ab einer Konzentration von 0,8 M war sowohl bei $\Delta makbAB$ als auch in $\Delta ste7AB$ keine Sporenbildung mehr feststellbar (Abb. 3.27 B, C). Im Gegensatz dazu war unterhalb einer Glukosekonzentration von 0,025 M mikroskopisch annähernd keine Differenz zwischen der Sporulationsfront des Wildtyps und der Mutanten erkennbar (Abb. 3.27 B, C II).

Die Untersuchungen mit synchronisiertem Myzel erfolgten auf identisch hergestellten Minimal-Medium-Platten mit Glukosekonzentrationen zwischen 0,0125 und 3,2 M. Das feste Medium wurde mit 20 ml einer Suspensionen aus flüssigem Minimal-Medium und 10^5 Sporen pro ml überschichtet und für 24 h bei 37°C inkubiert, sodass sich ein submerses, undifferenziertes Myzel entwickeln konnte (Kap. 2.4.1). Zum Einleiten der Differenzierung wurde im Anschluss an die submerse Kultivierung das flüssige Medium vollständig abgenommen. In der nun aeroben Kultivierung fängt das Myzel ab diesem Zeitpunkt mit der Differenzierung an. Nach 24 h, 48 h und 72 h wird die Entwicklung dokumentiert, außerdem werden Proben definierter Größe zur Quantifizierung der Sporenzahl entnommen. Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe der Durchflusszytometrie (Kap. 2.3.1).

Alle Proben, die auf Medium mit einer geringen Nährstoffverfügbarkeit von 0,0125 bis 0,2 M Glukose wuchsen, zeigten nach 24 h eine makroskopisch erkennbare leichte Braunfärbung, was auf eine einsetzende, schwache Sporulation hindeutet. Dagegen zeigten weder der Wildtyp noch die Mutanten, die auf Medien mit 0,4 bis 3,2 M Glukose wuchsen, erkennbare Verfärbungen (Abb. 3.28 B). Die Quantifizierung der Sporenmenge bestätigte die makroskopischen Beobachtungen und zeigte, dass mit zunehmender Glukosekonzentration die produzierte Sporenmenge nach 24 h abnimmt und ab einer Glukosekonzentration von 1,6 M gegen Null tendiert. Die Menge der von Wildtyp und den Ausschaltmutanten hervorgebrachten Sporen unterscheidet sich dabei nicht wesentlich (Abb. 3.28 C).

Nach 48 h kann eine parallel zur Glukosekonzentration zunehmende Dunkelfärbung für AB1.13 beobachtet werden. Bei geringer Glukoseverfügbarkeit bis 0,1 M verhalten

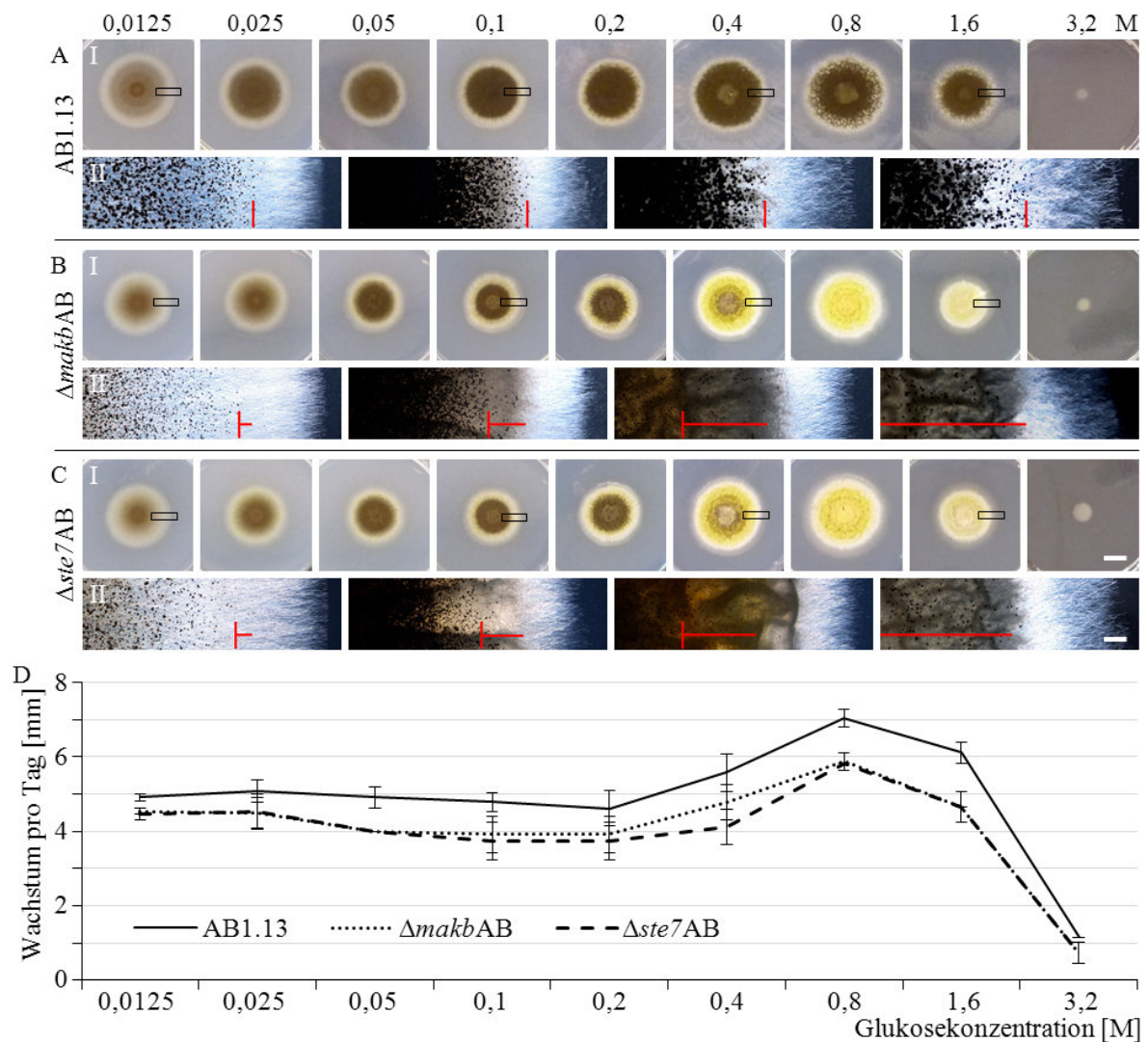
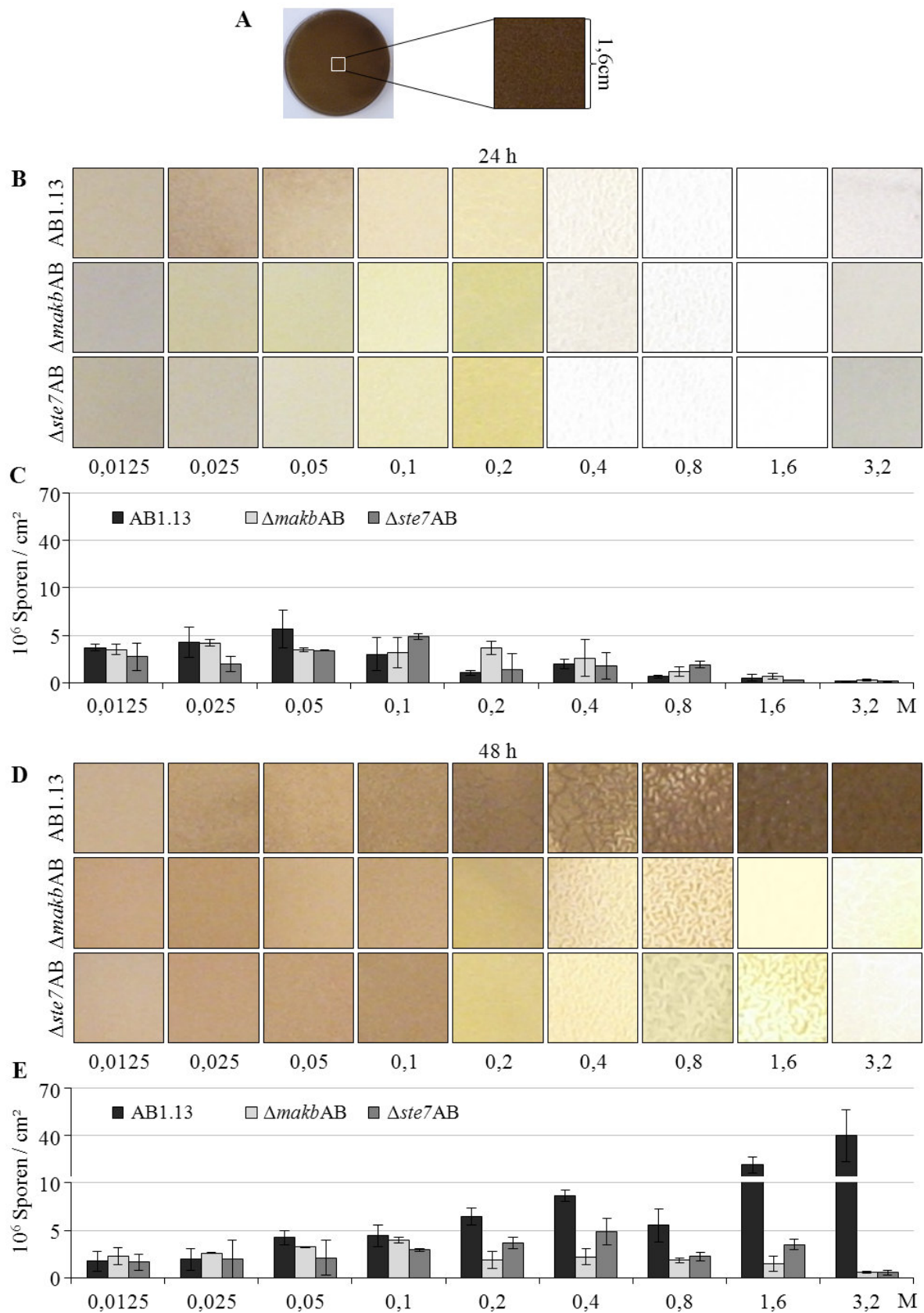


Abb. 3.27: Vergleich der Sporulation radiär wachsender Kolonien von *A. niger* Wildtyp, $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ auf Minimal-Medium mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen nach 96 h. Die Randbereiche der Kolonien auf Medium mit 0,0125, 0,1, 0,4 und 1,6 M Glukose sind 10-fach vergrößert dargestellt. Die Sporulationsfronten sind in den Vergrößerungen durch rote, vertikale Linie markiert. Die Differenz der Sporulationsfronten der Ausschaltmutanten zu der des Wildtyps wird durch horizontale Linien verdeutlicht (A-C, II). D: Radiale Wachstumsgeschwindigkeit der Kolonien bei den jeweiligen Glukosekonzentrationen. Größenstandard: A-C I: 1 cm, A-C II: 1 mm.

sich die Ausschaltmutanten und der Wildtyp identisch und sind makroskopisch nicht voneinander unterscheidbar. Ab einer Konzentration von 0,2 M Glukose verändert sich das Verhalten der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. So verminderte sich mit zunehmender Glukosekonzentration die Dunkelfärbung, sodass ab einer Konzentration von 1,6 M Glukose das Myzel vollständig weiß erscheint (Abb. 3.28 D). Die Quantifizierung der Sporenzahl bestätigte die Beobachtungen. Außerdem ist bei geringen Glukosekonzentrationen kein Unterschied bei der Sporenmenge zwischen dem Wildtyp und den

Mutanten erkennbar, was ebenfalls die makroskopischen Beobachtungen bestätigt. Mit steigender Glukosekonzentration nimmt die Sporenzahl der Wildtyp-Kolonien erheblich zu, wogegen die Sporenzahl der Mutanten bis zu einer Glukosekonzentration von



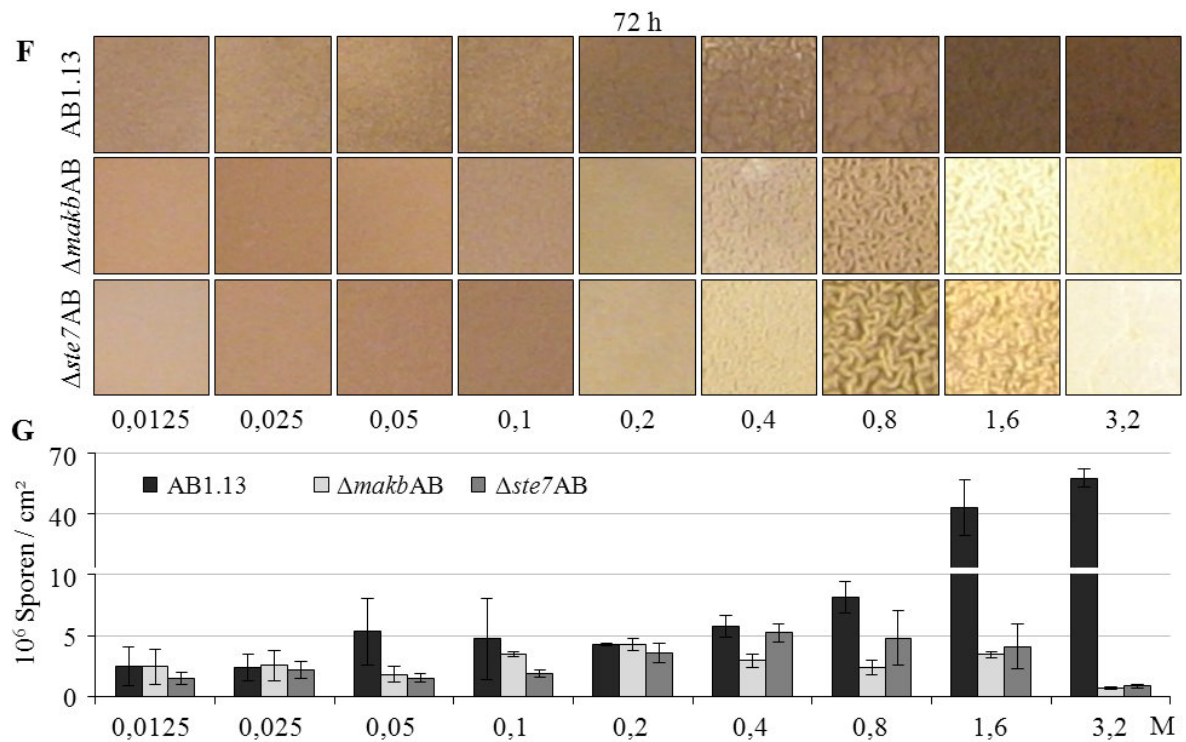


Abb. 3.28: Die Sporenbildung von $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ wird durch hohe Glukosekonzentrationen inhibiert. Die Bereiche B, D und F repräsentieren Ausschnitte von synchronisiert wachsendem Myzel (Kap. 2.4.1). Die einzelnen Kacheln stellen, wie in A dargestellt, Ausschnitte von mit Myzel bewachsenen Platten dar. Die Bereiche C, E und G sind Quantifizierungen der Sporenmenge pro cm² der entsprechenden Kolonien.

1,6 M konstant bleibt, bei 3,2 M aber weiterhin gegen Null tendiert (Abb. 3.28 E).

Die Messungen nach 72 h bestätigen die 48 h Daten. Im Bereich geringer Glukosekonzentration ist kein Unterschied zwischen den Stämmen erkennbar, bei sehr hohen Konzentrationen ist der Unterschied dagegen enorm. Die Grenze, ab der sich die Erscheinungsbilder deutlich trennen, verschiebt sich allerdings von 0,2 auf 0,8 M Glukose (Abb. 3.28 F). Die Quantifizierung der Wildtyp-Sporenzahl bestätigt ebenfalls den Verlauf der 48 h Ergebnisse. Für die Mutanten ist mit steigender Glukosekonzentration eine tendenziell leichte Steigerung der Sporenzahl erkennbar, abschließend bleibt der Einbruch der Sporulation aber weiterhin signifikant (Abb. 3.28 G).

Im Folgenden sollten nun die Ergebnisse mit den Erwartungen der unterschiedlichen Hypothesen Verglichen werden.

I. Hypothese

Eine größere Sporenmenge bzw. das frühere Einsetzen der Sporenbildung bei geringen

im Vergleich zu höheren Glukosekonzentrationen, war die Erwartung für den Wildtyp bei dieser Hypothese. Die Mutanten sollen dagegen keinerlei Veränderungen bei der Sporenbildung in Abhängigkeit von der Glukosemenge erwartet. Da die Ergebnisse diesen Erwartungen vollständig widersprechen, kann die Hypothese abgelehnt werden. MAKB ist demnach in *A. niger* nicht an der nährstoffabhängigen Induktion der Sporenbildung beteiligt.

II. Hypothese

Die zweite Hypothese geht von einer Beteiligung der MAP-Kinase an der Myzeldichte-abhängigen Induktion der Sporenbildung aus. Dabei wurde vermutet, dass die Glukoseversorgung keinen wesentlichen Einfluss auf die Sporenbildung des Wildtyps hat, wohingegen die Sporulation in den Mutanten mit steigenden Konzentrationen an Glukose verzögert und/oder vermindert einsetzen sollte. Unsere Ergebnisse bestätigen die Erwartung weitestgehend, nur bei sehr geringen Glukosekonzentrationen wichen die Ergebnisse von der Hypothese ab. Die Abweichungen sind wahrscheinlich durch den eingehendst genannten, hungerinduzierten Signalweg zu erklären, der, noch vor Erreichen der Grenz-Myzeldichte, die Sporenbildung induzierte. Dies würde außerdem erklären, weshalb bei den geringen Glukosemengen kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutanten erkennbar war. Somit kann davon ausgegangen werden, dass MAKB an der Myzeldichte-abhängigen Induktion der Sporenbildung beteiligt ist und der zweite Signalweg, der in den Ausschaltmutanten die Sporenbildung induziert, ausschließlich durch Hunger aktiviert werden kann. Um dies weiterführend zu klären, wurden die Auswirkungen von Hunger auf die Sporenbildung in Kapitel 3.2.5 weiterführend untersucht.

III. Hypothese

Die Hypothese vermutete einen allgemeinen, Nährstoff- und Myzeldichte-unabhängigen Einfluss von MAKB auf die Sporenbildung. Ausgehend von den erhaltenen Ergebnissen kann diese Hypothese abgelehnt werden.

Auswirkung von osmotischem Stress auf die Entwicklung von *Aspergillus niger*

Die Unterdrückung der Differenzierung und der Konidienbildung von $\Delta makbAB$ und

$\Delta ste7AB$ auf Medium mit hohen Glukosekonzentrationen war ein unerwartet deutlicher Phänotyp. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob dieser Phänotyp wie von uns prognostiziert von der Nährstoffversorgung, oder durch osmotischen Stress verursacht wird. Zu diesem Zweck wurden zu Standard-Minimal-Medium 11,7 bzw. 23,4 g/l Natriumchlorid gegeben. Die eingesetzte Salzmenge verursacht dabei einen osmotischen Druck der 0,4 bzw. 0,8 M Glukose im Medium entspricht. Für den Versuch wurde das Festmedium mittig mit 10^5 Sporen pro ml beimpft und für vier Tage bei 37°C inkubiert.

Nach der Inkubation war bei allen Kolonien eine deutliche Sporenbildung erkennbar (Abb. 3.29). Im direkten Vergleich der einzelnen Stämme mit ihren jeweiligen Kolonien auf Medium mit 0,4 bzw. 0,8 M Glukose wird deutlich, dass der beobachtete Phänotyp nicht auf osmotischen Stress, ausgelöst durch die hohen Glukosekonzentrationen, zurückzuführen ist.

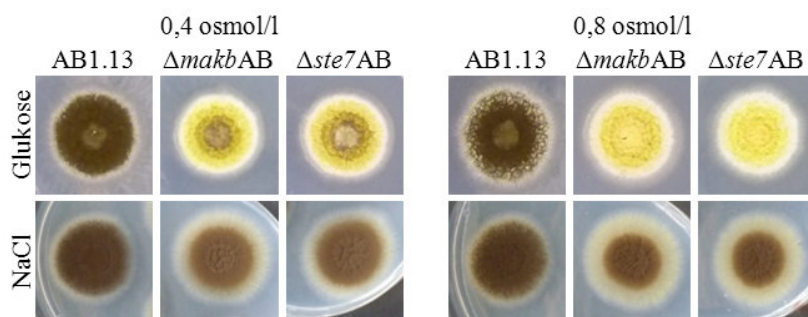


Abb. 3.29: Entwicklung von AB1.13, $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ auf Medium mit einem osmotischem Druck von 0,4 bzw. 0,8 osmol/l. Als osmotisch aktive Substanzen wurde zum einen Glukose, zum anderen Natriumchlorid eingesetzt. Myzelwachstum unter Standardbedingungen ist in Abb. 3.27 (A-C/I, 0,05 M Glukose) dargestellt.

3.2.5 Die Bildung von Konidien wird in Flüssigkultur durch Hungerstress induziert

In diesem Abschnitt sollte überprüft werden, ob die von den vorangegangenen Ergebnissen abgeleitete These, dass in *A. niger* zwei voneinander unabhängige Wege für die Induktion der Sporulation existieren, zutrifft. Entsprechend der Hypothese sollte einer der Wege dabei unabhängig von MAKB die Sporenbildung induzieren, wobei als Signal Nährstoffmangel vermutet wird. Ausgehend von zwei Veröffentlichungen wurde diese Annahme im Folgenden überprüft. Die erste Beobachtung besagt, dass *A.*

niger in Flüssigkultur nicht differenziert und demnach auch nicht sporuliert. Diese Eigenschaft wurde in dieser Arbeit bereits für die Synchronisierung von Myzel ausgenutzt (Cochrane 1958). Die zweite Veröffentlichung beschreibt, dass *A. niger* unter stickstofflimitierten Bedingungen in Flüssigkultur, entgegen seines üblichen Verhaltens, Sporenköpfchen und Sporen bildet. Es war dabei irrelevant, ob das Myzel als Pellet oder als disperses Myzel vorliegt. Die Myzeldichte scheint demnach keinen Einfluss auf die submerse Sporenbildung zu haben (Galbraith und Smith 1969).

Ausgehend von den bisherigen Ergebnissen und den Erkenntnissen aus den Veröffentlichungen wird nun postuliert, dass sowohl AB1.13 als auch die Mutanten $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ in Flüssigkultur Sporenköpfe und Sporen bilden, wenn sie unter Stickstoff- bzw. allgemeinen Nährstoffmangel leiden.

Der Versuch wurde, den Vorgaben entsprechend, in flüssig Schüttelkulturen durchgeführt. Es wurden in regelmäßigen Abständen Pellets entnommen und mikroskopisch auf Konidiophor- bzw. Konidienbildung untersucht.

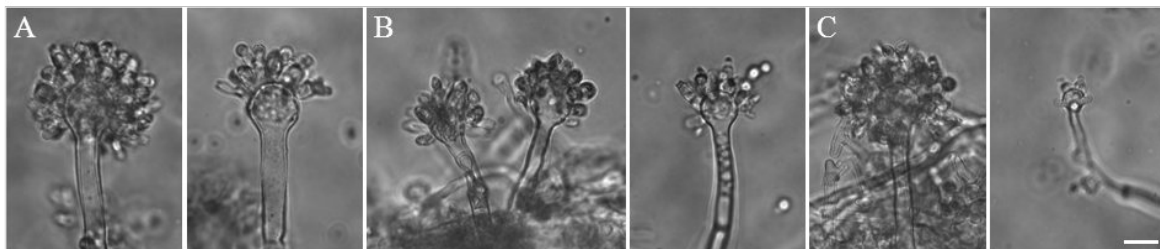


Abb. 3.30: Hungerstress induziert Konidienbildung in Flüssigkultur unabhängig von MAKB. In allen Stämmen bewirkt Nährstoffmangel eine für *Aspergillus niger* atypische Konidiophor- und Konidienbildung. **A)** AB1.13, **B)** $\Delta makbAB$, **C)** $\Delta ste7AB$. Größenstandard: 10 μm .

Alle Proben bildeten über dem gesamten Versuchszeitraum in Form und Anzahl makroskopisch und mikroskopisch nicht unterscheidbare Pellets. Sowohl die Kulturen von AB1.13 als auch die der beiden Mutanten $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ zeigten nach fünftägiger Inkubation eine bräunliche Verfärbung des Kulturmediums. Bei der mikroskopischen Analyse wurden in allen Proben Konidiophore und Konidien nachgewiesen. Auffällig dabei waren erhebliche phänotypische Unterschiede im Erscheinungsbild der einzelnen Konidiophore in den Kulturen (Abb. 3.30), wobei diese Variationen in allen Proben auftraten.

Die Ergebnisse dieses Experiments legen die Vermutung nahe, dass die Hypothese der Existenz eines zweiten, MAKB-unabhängigen und durch Nährstofflimitierung induzierten Signalweges für die Einleitung der Sporenbildung in *A. niger* zutrifft.

3.2.6 Bestimmung der minimalen Glukose-Konzentration für die MAKB induzierte Konidienbildung

Die Ergebnisse der vorangegangenen Kapitel zeigten, dass die Sporenbildung bei Nährstoffmangel MAKB unabhängig induziert werden kann. Aus den Daten von Kapitel 3.2.4 ist auch ersichtlich, dass es eine Grenzkonzentration an Glukose gibt, die unterschritten werden muss, um den alternativen Mechanismus der Sporeninduktion zu aktivieren. Diese Konzentration muss unterhalb von 0,2 M liegen, da zu Inkubationsbeginn $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ nicht in der Lage waren, oberhalb dieser Grenze im gleichen Maße wie AB1.13 die Sporenbildung zu induzieren. Mit Hilfe der Ausschaltmutanten sollte es daher möglich sein, die Grenzkonzentration zu bestimmen, ab der die Sporulation MAKB unabhängig induziert wird.

Für die Analyse musste die Glukosekonzentration sowie die Sporenzahl zu identischen Zeitpunkten bestimmt werden. Die ermittelte Glukosemenge beim Einsetzen der Sporulation entspricht bei diesem Versuchsaufbau der Grenzkonzentration für die zweite, MAKB unabhängige Induktion der Sporenbildung.

Die Durchführung des Versuchs erfolgte in Glasröhrchen. Diese wurden mit 5 ml einer Suspension aus Minimal-Medium mit 200 bzw. 400 mM Glukose und 10^6 Sporen pro ml beimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37°C. Da die Sporen absinken, am Boden keimen, die Hyphen anschließend nach oben wachsen und erst am zweiten Tag eine schwimmende Myzelmatte auf dem Flüssigmedium bilden, erfolgte die erste Probenahme 48 Stunden nach Versuchsbeginn. Für die Analyse der Glukosekonzentration wurden 200 µl Medium unmittelbar unterhalb des Myzels abgenommen. Die verbleibende Kultur wurde im Anschluss durch Vortexen homogenisiert und die Sporenzahl bestimmt. Aufgrund des Homogenisierens konnte jeder Probenansatz nur einmal verwendet werden, daher musste für jeden Analysezeitpunkt ein neues Probenröhrchen verwendet werden. Bei einer Anfangskonzentration von 200 mM Glukose waren nach zwei Inkubationstagen noch mindestens 160 mM Glukose im Medium, eine Sporenbildung war nicht erkennbar. Nach drei Tagen sank die Glukosekonzentration sowohl der $\Delta makbAB$ als

auch der $\Delta ste7AB$ Probe auf 115-130 mM und die Sporenbildung setzt ein (Abb. 3.31, links).

Bei einer Anfangskonzentration von 400 mM Glukose waren in der $\Delta ste7AB$ -Probe beim Einsetzen der Sporenbildung am vierten Tag noch 150 mM Glukose vorhanden. In der $\Delta makbAB$ Probe wurden am fünften Tag erstmals Sporen nachgewiesen, zu diesem Zeitpunkt befanden sich 130 mM Glukose im Medium der Probe (Abb. 3.31, rechts).

Sowohl das Myzel von $\Delta makbAB$ als auch das Myzel von $\Delta ste7AB$ begann demnach mit der Sporenbildung beim Unterschreiten einer Glukosekonzentration von 110-150 mM Glukose im Medium, unabhängig von der Anfangskonzentration.

A. nigers MAKB-unabhängiger Signalweg für die Induktion der Sporenbildung ist demnach nährstoffabhängig, von den Umgebungsbedingungen unabhängig und wird beim Unterschreiten einer Glukosekonzentration von 110-150 mM aktiviert.

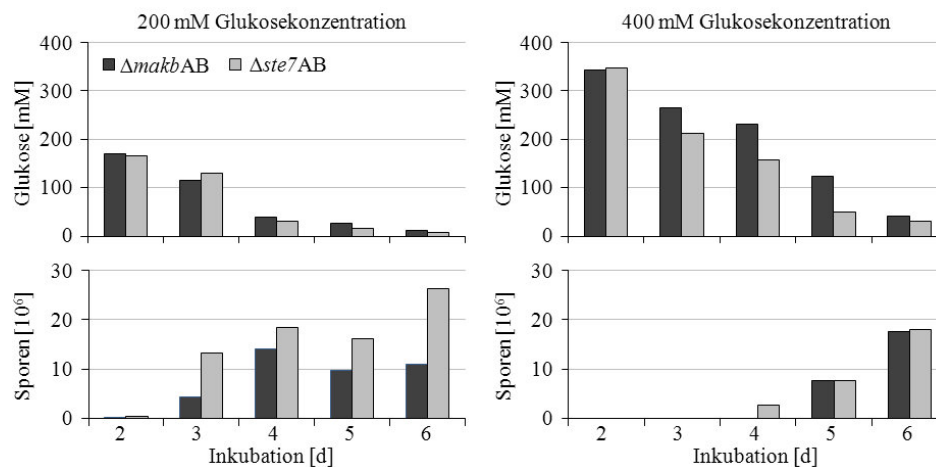


Abb. 3.31: Die Sporenbildung in $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ setzt unabhängig vom Myzelalter beim Unterschreiten einer Glukosekonzentration von 110-150 mM ein. Die oberen Diagramme stellen die Glukosekonzentrationen in Minimal-Medium, die unteren die vom Myzel bei der jeweiligen Konzentration gebildete Sporenmengen da. Untereinander angeordnete Balken repräsentieren die gleiche Probe.

3.2.7 Herstellung von *makb-gfp*-Stämmen

Um eine Verbindung zwischen den beobachteten Phänotypen und der Expression bzw. Akkumulation der Kinase MAKB zu bekommen, wurde diese mit GFP markiert. Für die Lokalisierung wurden zwei unterschiedliche Strategien angewandt. Zum einen wurde *makb* am ursprünglichen Genort mit der *gfp*-Gensequenz ergänzt, zum anderen wurde eine zusätzliche Kopie von *makb*, wieder ergänzt mit der *gfp*-Sequenz, unter Kontrolle des konstitutiv aktiven P_{pki1} Promotors, ektopisch eingebracht. Beide Vorgehensweisen bieten Vorteile. Nutzt man den nativen Promotor eines Gens und belässt dieses am ursprünglichen Genort, stimmt die beobachtete Expression mit der nativen überein. Daher können Fehllokalisierungen, verursacht durch die Überexpression von MAKB, ausgeschlossen werden. Der große Nachteil nativer Promotoren ist ihre zumeist schwache Expression, die eine Lokalisierung erschwert oder unmöglich machen kann. Aus diesem Grund werden Proteine häufig unter der Kontrolle konstitutiv aktiver Promotoren überexprimiert. Der Vorteil dieser Methode ist die gute Detektierbarkeit der GFP-Signale, die Nachteile sind allerdings mögliche Fehllokalisierungen sowie die Expression der Proteine in Entwicklungsstadien der Zellen, in denen sie normalerweise nicht exprimiert werden. Aus diesem Grund sind Aussagen von Lokalisierungsmustern, die mit Hilfe von Überexpressionsstämmen gewonnen werden, nur in Verbindung mit Daten aus Lokalisierungsstudien mit nativ exprimierten Protein aussagekräftig. Die in dieser Arbeit hergestellten und für Lokalisierungsuntersuchungen relevanten Stämme sind in der Tabelle 3.2 dargestellt.

Tab. 3.2: Für Lokalisierungsstudien verwendete, *makb-gfp* markierte *Aspergillus niger*-Stämme

Name	Genotyp
<i>makb-gfp</i> AB	AB1.13 <i>makb-gfp</i> ; <i>pyrG</i> ⁺
<i>P_{pki1}-makb-gfp</i> AB	AB1.13 <i>P_{pki1}-makb-gfp-T_{gla}</i>

Für die Herstellung des *makb-gfp*AB Stammes wurde, analog zum Ausschalten von Genen, eine „Knock-in“-Strategie verwendet (Abb. 5.31). Hierfür wurde mit den Primern mak-b-Yeast-For und mak-b-gfp-Rev 800 bp des 3'Bereichs von *makb* ohne Stoppcodon

amplifiziert. Als Template diente genomische DNA aus AB1.13. Des Weiteren wurde mit den Primern *gfp-mak-b-For* und *gfp-pyrG-Rev* das 720 bp lange *gfp*-Gen und mit den Primern *pyrG-gfp-For* und *pyrG-mak-b-3'-Rev* das 884 bp lange *pyrG*-Gen plus 476 bp der *pyrG*-Promotorsequenz amplifiziert. Für die Erzeugung der beiden Fragmente diente der Vektor pARAn37-*gfp* als Template. Als letztes noch benötigte Fragment wurde mit den Primern *mak-b-3'-pyrG-For* und *mak-b-3'-Yeast-Rev* ein 950 bp langes Fragment der *makb* „Downstream“-Sequenz isoliert, als Template diente wieder genomische AB1.13-DNA. Alle Primer besitzen Überhänge zu den angrenzenden Fragmenten, sodass diese, nachdem sie zusammen mit dem linearisierten Vektor pRS426 in die Hefe FY834 transformiert wurden, von dieser zusammengefügt werden konnten. Die vollständige, 3850 bp große „Knock-in“-Kassette wurde mit den äußeren Primern aus dem Vektor amplifiziert und in AB1.13 transformiert. Die Selektion erfolgte durch die von *pyrG* vermittelte Uridin-Prototrophie, sowie anhand der Fluoreszenz der Isolate. Die korrekte Integration wurde in den ausgewählten Transformanten mittels PCR mit den Primern *mak-b-Test-For* und *eYFP R* überprüft. Das dabei entstehende, 1944 bp lange Amplifikat beginnt im 5'-Bereich des *makb*-Gens und umfasst den als Flanke genutzten Bereich von *makb* sowie das vollständige *gfp*-Gen (Abb. 3.32 B). Abschließend wurden vier Transformanten ausgewählt und vom Primer *mak-b-Test-For* ausgehend sequenziert. Keine Sequenz wies einen Fehler auf, sodass zwei Transformanten ausgewählt, nach einer abschließenden Aufreinigung und unter der Bezeichnung *makb-gfpAB* (1 bzw. 2) in die Stammhaltung aufgenommen wurden.

Der Überexpressionsstamm wurde durch Transformation des Plasmids pUB0038 hergestellt. Das Plasmid beruht auf dem veröffentlichten Plasmid pARAn37 (Roth und Dersch 2010) und wurde von Ulrike Brandt zur Verfügung gestellt. Die Selektion erfolgte auf die durch *pyrG* vermittelte Uridin-Prototrophie der transformierten Stämme. Eine weitere Selektion erfolgte anhand der Fluoreszenzstärke der Transformanten. Die Integration des Plasmids sowie die Lage von *makb* hinter den Promotor P_{pki1} wurde in den ausgewählten Transformanten mittels PCR mit den Primern Seq PkiA (F) und PMF2 (Isao) überprüft. Das dabei entstehende, 1604 bp lange Amplifikat beginnt im P_{pki1} Promotor, umfasst das gesamte *makb*-Gen sowie 93 bp der *gfp*-Gensequenz (Abb. 3.32 C, D). Von den positiv getesteten Transformanten wurden zwei aufgrund ihrer Fluoreszenzstärke ausgewählt und als *Ppki-makb-gfpAB* (1 bzw. 2) in die Stamm-

sammlung aufgenommen. Da die Überexpressionsstämme auf AB1.13 beruhen, liegt in ihm neben der *makb-gfp* noch die unmarkierte *makb*-Kopie unter Kontrolle des *makb*-Promotors vor. Alle folgenden Experimente wurden mit den Stämmen *makb-gfp*AB (1) bzw. *Ppki-makb-gfp*AB (1) durchgeführt, aus diesem Grund wurde der Index in der folgenden Dokumentation vernachlässigt.

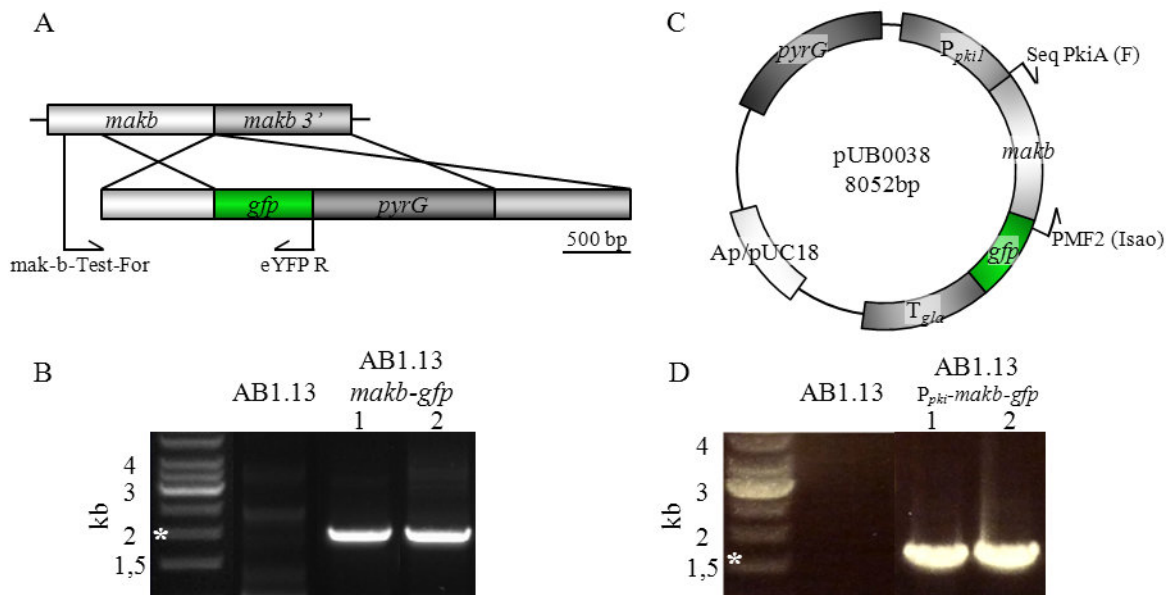


Abb. 3.32: Für die Analyse der nativen Expression wird *makb* mit der *gfp*-Gensequenz erweitert.

A: Aufbau der durch YRC hergestellten „Knock-in“-Kassette für die Erweiterung der *makb* durch die *gfp*-Sequenz am ursprünglichen Genlocus. Sowie Lage der Primer für die Integrationskontrolle. B: Die erwartete Bandengröße der „Knock-in“-Integrationskontrolle entspricht 1944 bp (Stern). C: Aufbau des Plasmids pUB0038 für die Überexpression von *makb-gfp* in AB1.13 mit Lage der Kontrollprimer. D: Die erwartete Bandengröße der Integrationskontrolle des Überexpressionskonstruktes beträgt 1604 bp (Stern).

3.2.8 MAKB wird in Konidiophoren exprimiert.

Ausgehend von den Ergebnissen der vorangegangenen Experimente wurde mit Hilfe des GFP-Tags MAKB lokalisiert. Da die Ausschaltung von MAKB auf alle Entwicklungszeitpunkte Auswirkungen hat, wurde die Expression und Akkumulation von MAKB in *A. niger* während der gesamten vegetativen Entwicklung dokumentiert.

Die Analyse erfolgte in Sporen, Keimlingen, jungen und alten Hyphen sowie auf sporulierendem Myzel parallel in *makb-gfp*AB und *Ppki-makb-gfp*AB. Für die Untersuchung wurden die Sporen auf Minimal-Medium ausplattiert und bei 37°C bis zum Erreichen

der entsprechenden Entwicklungsstadien inkubiert. Die Mikroskopie mit einem 100-fach Objektiv. Bei der Analyse der Präparate wurden, soweit möglich, gleiche Einstellungen verwendet, sodass die Expressionsstärken verglichen werden konnten.

In *makb-gfpAB*-Sporen, Keimlingen und Hyphen konnte kein GFP Signal detektiert werden (Abb. 3.33 A, C, E). Ab Einsetzen der Sporulation wurde in den Hyphen ein schwaches zytoplasmatisches Signal detektiert, in den Sporenköpfchen kam es dagegen zu einer deutlich erkennbaren Akkumulation von MAKB-GFP. Das Signal war dabei nicht gleichmäßig über das gesamte Sporenköpfchen verteilt, sondern konzentrierte sich vor allem in den Metulae und den Phialiden, wodurch sich eine ringförmige Struktur um das Vesikel herum bildete (Abb. 3.33 H). Häufig kam es außerdem zu einer Akkumulation von MAKB in jungen Vesikeln, um die sich noch keine Sterigmata gebildet hatten. Mit Hilfe von radiär wachsenden Kolonien konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die verstärkte Akkumulation von MAKB in den Konidiophoren in einem definierten Abstand zur Myzelfront stattfand. Da nach einsetzen der Konidiogenese die gebildeten Sporen das GFP-Signal abschirmten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass unter den Sporen das MAKB-GFP weiterhin akkumuliert. Ein Nachweis ist allerdings nicht möglich. Für weitere Analysen der Lokalisierung von MAKB-GFP mit Hilfe von synchronisierten Myzel bleibt somit nur ein Zeitfenster von wenigen Stunden, beginnend ca. 24 Stunden nach dem Einsetzen der Differenzierung.

Das GFP-Fluoreszenzsignal in *Ppki-makb-gfpAB* war, den Erwartungen an dem konstitutiv aktiven Promotor entsprechend, deutlich intensiver. Es war bereits nach kurzer Inkubationszeit in ungekeimten Sporen, sowie in Keimlingen und Hyphen detektierbar. Das Signal akkumulierte dabei vor allem in den Kernen und lag nur im geringen Maß im Zytoplasma vor. In sporulierenden Kulturen war, analog zur Lokalisierung in *makb-gfpAB*, eine deutliche Konzentrierung des Signals in den Metulae und Phialiden erkennbar.

Ob das GFP-Signal nach Einsetzen der Sporenbildung weiterhin in den Sterigmata akkumuliert war nicht nachweisbar. Zum einen verdeckten die Sporen die Sterigmata und zum anderen förderte die hydrophobe Oberfläche der Sporen die Bildung von Luftkammern um die Sporenköpfe herum, wodurch die Mikroskopie unmöglich wurde. Darüber hinaus weist Melanin eine Eigenfluoreszenz auf, sodass ein spezifisches MAKB-GFP Fluoreszenzsignal nicht immer eindeutig von Autofluoreszenz unterschied-

den werden konnte.

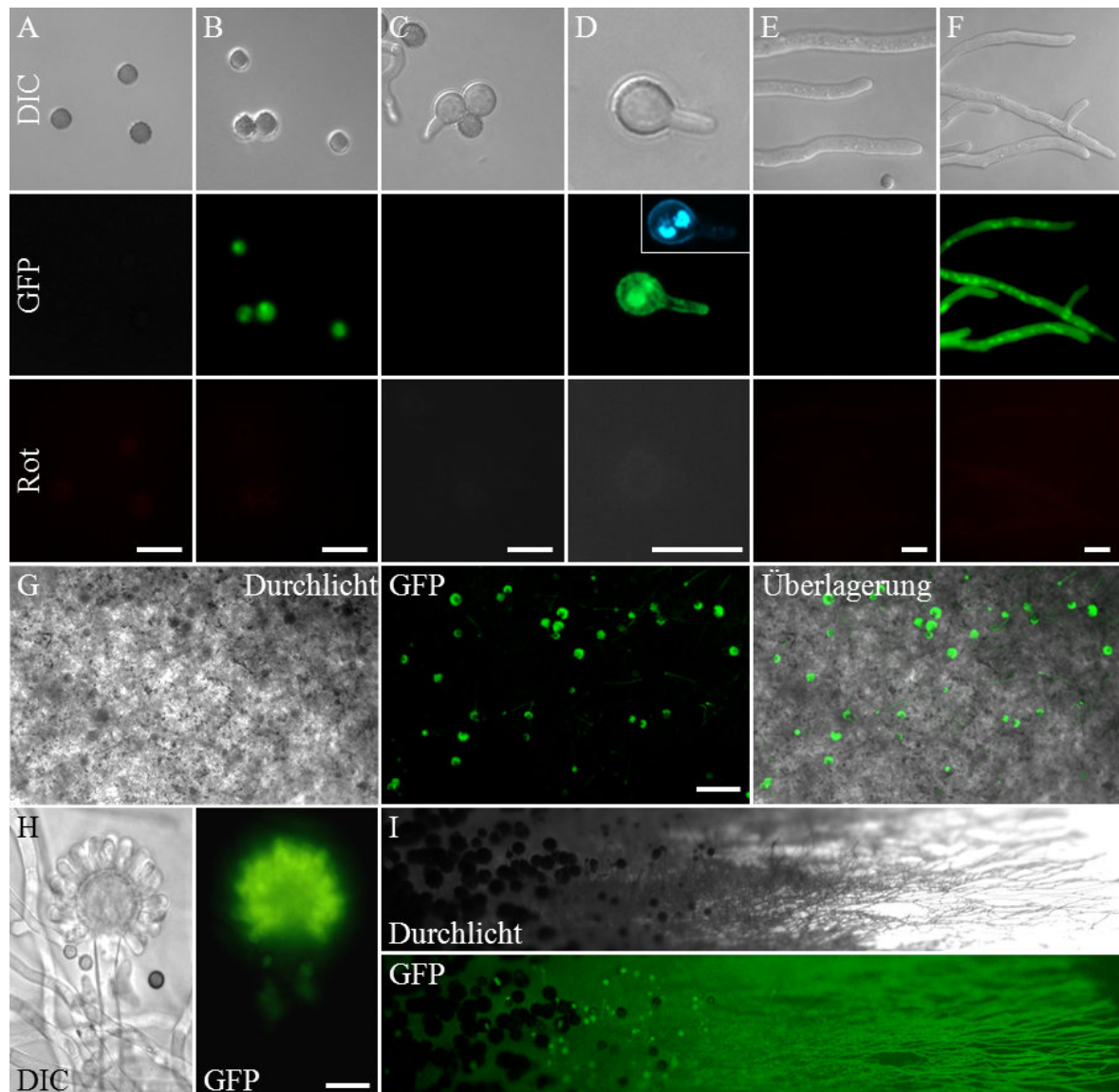


Abb. 3.33: Nativ exprimiertes MAKB akkumuliert vor allem in sich entwickelnden Sporenköpfen. A, C, E, G-I: *makb-gfpAB*, B, D, F: *Ppki-makb-gfpAB*. Expression von MAKB-GFP in A, B: Sporen, C,D: Keimlinge und E, F: Hyphen unter nativen Bedingungen bzw. der Kontrolle des *Ppki1*-Promotors. Rechte, obere Ecke von D-GFP: DAPI Färbung zum Nachweis der Akkumulation von MAKB-GFP in den Kernen des *Ppki-makb-gfpAB* Stammes. G-I: Expression von MAKB-GFP in Sporenköpfen. H: Akkumulation von MAKB-GFP in den Sterigmata der Sporenköpfe. I: räumlich begrenzter Bereich der starken MAKB-GFP-Expression in den Sporenköpfen radial wachsender Kolonien sowie der Nachweis, dass MAKB auch in jungen Hyphen exprimiert wird. Größenstandard: A-F, H: 10µm, G, I: 1 mm.

3.2.9 Nährstoffabhängige Detektion von MAKB-GFP in Konidiophoren.

Die Untersuchungen der nährstoffabhängigen Induktion der Sporenbildung (Kap. 3.2.4) offenbarten keinen Unterschied im Verhalten zwischen dem Wildtyp und den Ausschaltmutanten bei sehr geringen Ausgangskonzentrationen an Glukose. Demgegenüber war ein deutlicher Unterschied bei der Fähigkeit, bei hohen Glukose-Ausgangskonzentrationen Konidiophore zu bilden, erkennbar. Entsprechend kann vermutet werden, dass die MAP-Kinase an der Induktion der Sporenbildung auf nährstoffreichen Medium beteiligt ist. Demnach sollte MAKB auf Glukose-reichen Medium nicht nur stärker exprimiert werden als auf Glukose-armen Medium, sondern auch verstärkt in den Konidiophoren lokalisieren.

Für den Versuch wurden Platten mit Minimal-Medium mit 0,025 bzw. 0,2 M Glukose verwendet. Die Platten wurden mit einem Tropfen einer Konidiensuspension von *makb-gfpAB* beimpft und für 72 h bei 37°C inkubiert. Für die mikroskopische Untersuchung wurden aus den Kolonien ca. 2 mm breite Bereiche, von der Koloniemitte bis zur Hyphenfront mit einem Skalpell herausgetrennt, seitlich auf einen Objektträger gelegt und bei 40-facher Vergrößerung mikroskopiert.

Die Aufnahmen zeigten ein starkes GFP-Signal in den Vesikeln der Konidiophore im Randbereich von *makb-gfpAB* auf Medium mit 0,2 M Glukose (Abb. 3.34). Auf Medium mit 0,025 M Glukose akkumulierte MAKB-GFP dagegen nicht in den Vesikeln. Aus diesen Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass MAKB bei ausreichender Glukoseverfügbarkeit an der Sporenbildung beteiligt ist, auf Glukose-armen Medium die Konidiophorentwicklung dagegen unabhängig von MAKB verläuft.

Des Weiteren wies das junge Myzel im Randbereich der Kolonie bei beiden Glukosekonzentrationen ein deutliches GFP-Signal auf, in den älteren Myzelbereichen der Koloniemitte war dagegen kein zytoplasmatisches GFP-Signal detektierbar. Dies unterstützt die Beobachtungen, dass MAKB an vielen Prozessen der Zelle, wie z.B. dem Hyphenwachstum, beteiligt ist und nicht nur bei der Regulierung der Konidienbildung eine Rolle spielt.

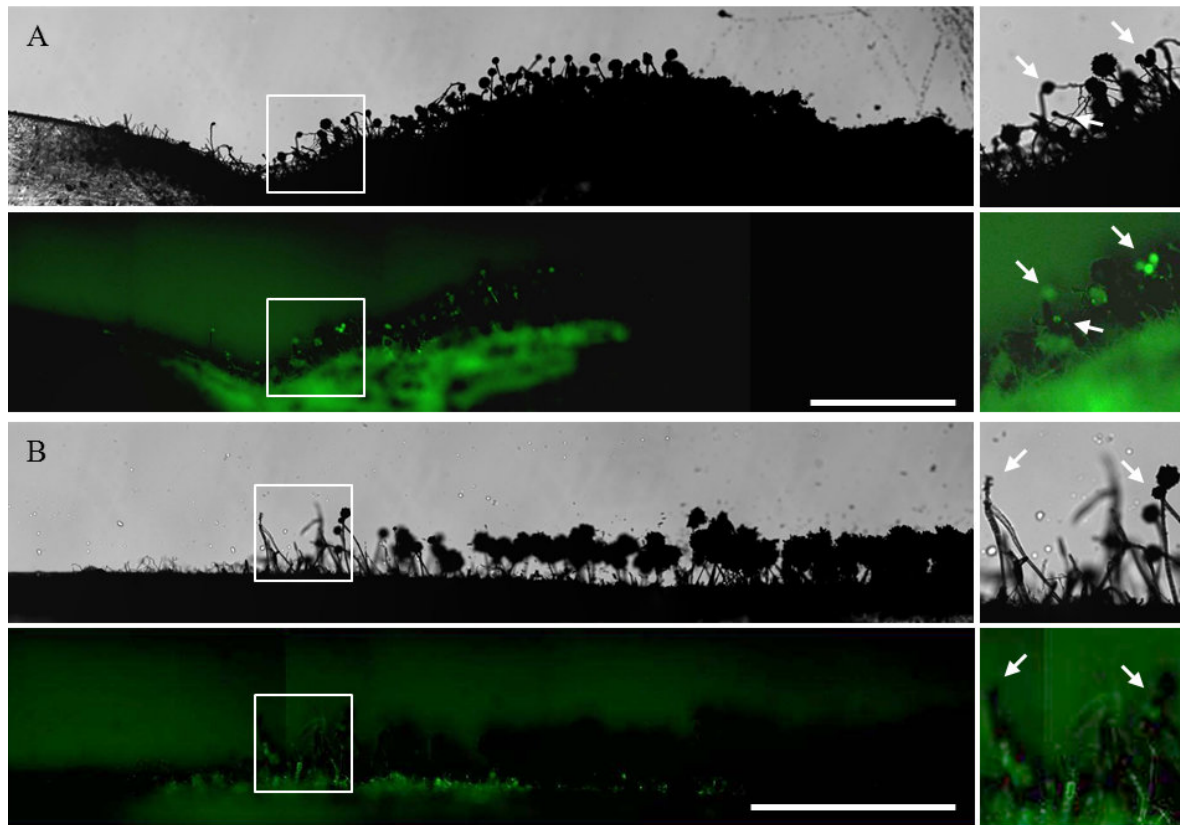


Abb. 3.34: Seitliche Betrachtung der Fluoreszenz von MAKB-GFP in *makb-gfpAB*. Die Inkubation erfolgte auf Minimal-Medium mit 0,2 (A) bzw. 0,025 M (B) Glukose. Die Pfeile in den Vergrößerungen deuten auf junge Konidiophore. Größenstandard: 500 μm .

3.2.10 MAKB-GFP ist in Flüssigkultur nicht detektierbar.

Aus biotechnologischer Sicht bildeten die Erkenntnisse aus den Untersuchungen der orthologen Kinasen in *T. virens* und *A. nidulans* einen Ansatzpunkt für die Arbeit mit MAKB in *A. niger* (Kap. 3.2). Dabei wurde u.a. ein Augenmerk auf Veränderungen der Pelletmorphologie in den Ausschaltmutanten gelegt, da sich hieraus Hinweise auf sekretionsrelevante Mechanismen ergeben können. Allerdings konnten bei den morphologischen Untersuchungen von ΔmakbAB keine reproduzierbaren Veränderungen der Pelletmorphologie beobachtet werden (Kap. 3.2.3). Es sollte daher festgestellt werden, ob bzw. zu welchen Zeitpunkten MAKB in Flüssigkultur exprimiert wird.

Die Untersuchungen erfolgten mit den Stämmen *makb-gfpAB* und als Kontrolle sowie als Referenz für die Expressionsstärke mit *Ppki-makb-gfpAB*. Beide Stämme wurden parallel in flüssigem Minimal-Medium bei 37°C und 80 UpM inkubiert. Die Probenahme erfolgt zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten, wobei sich diese in

Flüssigkultur bei *A. niger* auf Keimung und Hyphenwachstum beschränken (Kap. 1.3.4).

Bei der Analyse der Proben konnte keine Expression von MAKB in Sporen, Keimlingen (o. Abb.) oder Hyphen (Abb. 3.35) des Stammes *makb-gfpAB* nachgewiesen werden. Der Überexpressionsstamm *Ppki-makb-gfpAB* dagegen zeigte zu allen Zeitpunkten eine Expression von MAKB-GFP, wobei sich ein identisches Akkumulationsmuster wie auf Festmedium ergab.

MAKB wird diesen Daten zu Folge nicht oder zumindest nicht mikroskopisch detektierbar in Flüssigmedium exprimiert.

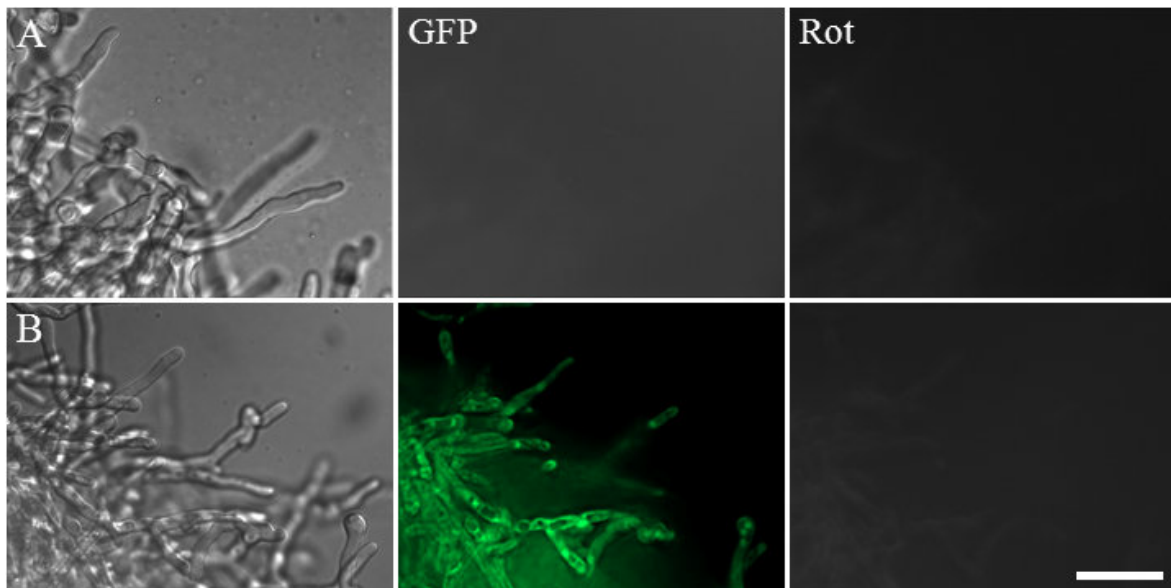


Abb. 3.35: MAKB-GFP konnte in Flüssigkultur zu keinem Zeitpunkt detektiert werden. A: trotz einer Belichtungszeit von 1800 ms weisen weder der äußere noch der innere Hyphenbereich von *makb-gfpAB*-Pellets eine Expression von MAKB auf. B: MAKB-GFP-Expression in *Ppki-makb-gfpAB*, aufgenommen mit 300 ms Belichtungszeit. Die Rotfilteraufnahmen dienen der Kontrolle auf Autofluoreszenz der Proben. Größenstandard: 20 μm .

3.2.11 Herstellung der *ste7daAB*-Mutante

Neben der Unterbrechung eines MAP-Kinase-Signalwegs durch die Entfernung zentraler Bestandteile sowie der Lokalisierung des Zielproteins, z.B. durch die Markierung mit dem GFP-Tag, stellt die permanente Aktivierung eines Signalwegs eine weitere Methode zur Untersuchung der Funktion von MAP-Kinasen dar. Es wird dabei angenommen,

dass die dauerhafte Aktivierung des Signalwegs eine Verstärkung der Expression der Zielgene der MAP-Kinase bewirkt. Daher können durch diese Methode weitere Prozesse, an denen die Kinasen beteiligt sind, identifiziert werden, die bei der Unterbrechung des Signalwegs, z.B. aufgrund von Redundanzen, nicht sichtbar werden.

Für MAKB bedeutet dies, dass die übergeordnete MAP-Kinase STE7 so verändert werden muss, dass sie dauerhaft die Struktur und Oberflächeneigenschaften von phosphorylierten STE7 einnimmt und somit MAKB kontinuierlich phosphoryliert. Im Allgemeinen beruht die Aktivierung von Kinasen auf der Bindung von PO_4^{3-} an die Aminosäuren Threonin, Serin und/oder Tyrosin. Durch die Anlagerung werden die Bereiche negativ geladen und es kommt zu einer Konformationsänderung der Kinase, sodass sie mit ihrem Ziel interagieren kann. Das Einbringen einer negativ geladenen Aminosäure anstelle der phosphorylierbaren Aminosäuren verursacht ebendiese Konformationsänderung dauerhaft, was gleichbedeutend mit der Simulierung einer permanenten Aktivierung der betroffenen Kinase ist (Müller *et al.* 2003). Eine direkte Veränderung von MAKB ist nicht möglich, da bereits gezeigt werden konnte, dass eine solche Mutation in MAKB Homologen zu falschen Faltungen und somit funktionslosen MAP-Kinasen führt. Des Weiteren sollte in den folgenden Untersuchungen die permanente Aktivierung des MAKB-Signalwegs bestätigt werden. Hierzu wurden Antikörper verwendet, die in einem Western Blot spezifisch die phosphorylierte Form von MAKB erkennen. Eine Mutation innerhalb von MAKB würde diesen Nachweis unmöglich machen.

Da funktionelle Bereiche in MAP-Kinasen hoch konserviert sind, konnten die Aminosäuren Serin 218 und Threonin 222 als Elemente der Phosphorylierungsstelle von STE7 identifiziert werden. Beide Aminosäuren sollten durch die negativ geladene Asparaginsäure ersetzt werden. Das mutierte STE7 soll in den Vektor pARAn37 ligiert und anschließend ektopisch in AB1.13 exprimiert werden, sodass es als zusätzliche Kopie neben dem nativen STE7 in den Zellen vorliegt. Im Vektor wird die Expression des mutierten *ste7* von dem starken P_{pki1} -Promotor kontrolliert. Da es unabhängig vom Zustand der nativen STE7-Kinase MAKB phosphoryliert, gilt es als dominant aktiv. Die mutierten Stämme werden entsprechend als *ste7* **dominant aktiv** (*ste7daAB*) bezeichnet.

Die Herstellung des mutierten Gens erfolgte durch YRC. Hierfür wurde *ste7* zunächst in zwei im gewünschten Mutationsbereich überlappende Bereiche aufgeteilt und am-

plifiziert. Die Primer Ste7-Yeast-For und Ste7-S218-T222D-Rev erzeugen das 851 bp lange 5'-Fragment und die Primer Ste7-S218-T222D-For und Ste7-Yeast-Rev das 1058 bp lange 3'-Fragment von *ste7*. Der Primer Ste7-Yeast-For enthält eine *EcoRI* und der Primer Ste7-Yeast-Rev eine *XbaI* Schnittstelle für die gerichtete Integration in den Vektor pARAn37. Außerdem enthalten beide Primer eine für des YRC notwendige homologe Sequenz zum Hefvektor pRS426. Die beiden Primer Ste7-S218-T222D-Rev und Ste7-S218-T222D-For enthalten die gewünschten Mutationen und sind komplementär zueinander (s. Tab. 2.10). Beide Fragmente wurden zusammen mit dem linearisierten Vektor pRS426 in die Hefe FY834 transformiert (Kap. 2.8.7). Das fertige Konstrukt wurde aus dem pRS426 ausgeschnitten, in den Vektor pARAn37 ligiert und in *E. coli* vervielfältigt. Aus einigen der erhaltenen *E. coli*-Kolonien wurde anschließend das Plasmid isoliert und testverdaut. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde ein Plasmid ausgewählt und mit dem Primer Ste7-Seq-Primer sequenziert. Die Sequenzierung bestätigte die gewünschten Mutationen. Der nun vollständige Vektor wurde pUB0280a genannt, er enthält als Selektionsmarker das *pyrG*-Gen zur Komplementierung der Uridin-Auxotrophie von AB1.13 (Abb. 3.36).

Die Selektion der Transformanten erfolgte auf Medium ohne Uridin. Die Transformationsplatten enthielten rund 40 Einzelkolonien von denen ca. 25% eine leicht hellere Sporenfärbung im Vergleich zu sporenbedeckten Wildtyp-Kolonien aufwiesen. Es wurden 11 Primärtransformanten vereinzelt und die Integration des Plasmids per PCR mit den Primern Seq PkiA (F) bzw. Seq TglaA (R) überprüft. Sechs Transformanten zeigten das für die Integration des Plasmids erwartete Bandenmuster. Von diesen wur-

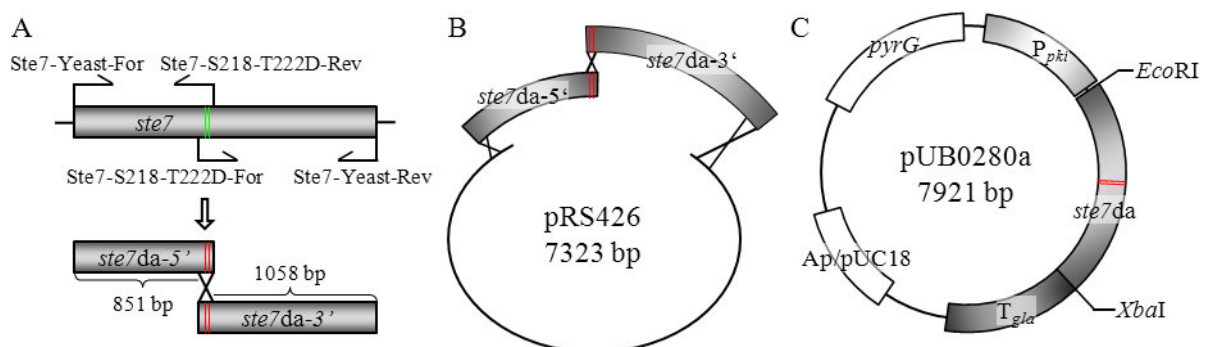


Abb. 3.36: Herstellung der dominant aktiven STE7 Mutante. **A:** Primer zur Amplifizierung der *ste7*-Fragmente mit den gewünschten S218D und T222D Mutationen. **B:** Zusammenbau der *ste7* Fragmente durch YRC **C:** Aufbau des Plasmids pUB280a, das für die ektopische Integration des dominant aktiven *ste7* verwendet wurde.

den zwei Transformanten ausgewählt, bei denen die Integration des Plasmids sowie das Vorhandensein der Mutation im eingebrachten *ste7*-Gen nochmals mittels Sequenzierung bestätigt wurde. Die beiden Transformanten wurden nach nochmaliger Einzelsporensortierung als *ste7*daAB (1 bzw. 2) in die Stammsammlung aufgenommen.

3.2.12 Die dauerhafte Aktivierung von MAKB beeinflusst die morphologische Entwicklung von *Aspergillus niger*

Da die Expression von Genen von ihrer Position im Genom beeinflusst werden kann und es sich bei den *ste7*daAB-Stämmen um ungerichtet erzeugte Mutanten handelt, wurden die Versuche mit den *ste7*daAB-Stämmen immer mit beiden Mutanten parallel durchgeführt.

Als erstes wurden die Auswirkungen der dauerhaften Aktivierung des MAKB-Signalwegs auf das makroskopische Erscheinungsbild untersucht. Für den Versuch wurden von AB1.13 sowie *ste7*daAB (1 und 2) Sporensuspensionen mit frisch geernteten und filtrierten Sporen angefertigt. Von jeder Suspension wurde ein 10 µl Tropfen (10^5 Sporen) auf Minimal-Medium mit Uridin aufgebracht. Die Inkubation erfolgt bei 37°C und einem 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus. Die Entwicklung der Kolonien wurde nach 48, 72 und 96 h dokumentiert.

Im Gegensatz zu den Ausschaltmutanten war bei den dominant aktiven Mutanten eine, wenngleich reduzierte, Sporenbildung bereits nach 48 h erkennbar (Abb. 3.37). Die Stärke der Reduktion schwankte dabei zwischen den Mutanten, was auf eine unterschiedliche Expression und somit einen unterschiedlich starken Einfluss der mutierten Kinase auf die Entwicklung von *A. niger* hindeutet. Auch die Sekretion einer dunklen Substanz ins Medium konnte bei beiden Mutanten beobachtet werden. Die Sekretionsstärke schwankte dabei deutlich zwischen den Mutanten und fiel, zumindest bei der *ste7*daAB (1)-Mutante, deutlich geringer im Vergleich zu den Ausschaltmutanten (Abb. 3.18) aus. Darüber hinaus war der makroskopische Abstand zwischen Konidiophor- und Myzelfront in der *ste7*daAB (1)-Mutante gegenüber dem Wildtyp deutlich vergrößert, wohingegen die *ste7*daAB (2)-Mutante nur geringe Veränderungen in diesem Bereich aufwies. Somit zeigen beide dominant aktiven Mutanten deutliche Veränderungen gegenüber dem Wildtyp und sind morphologisch auch von den Ausschaltmutanten un-

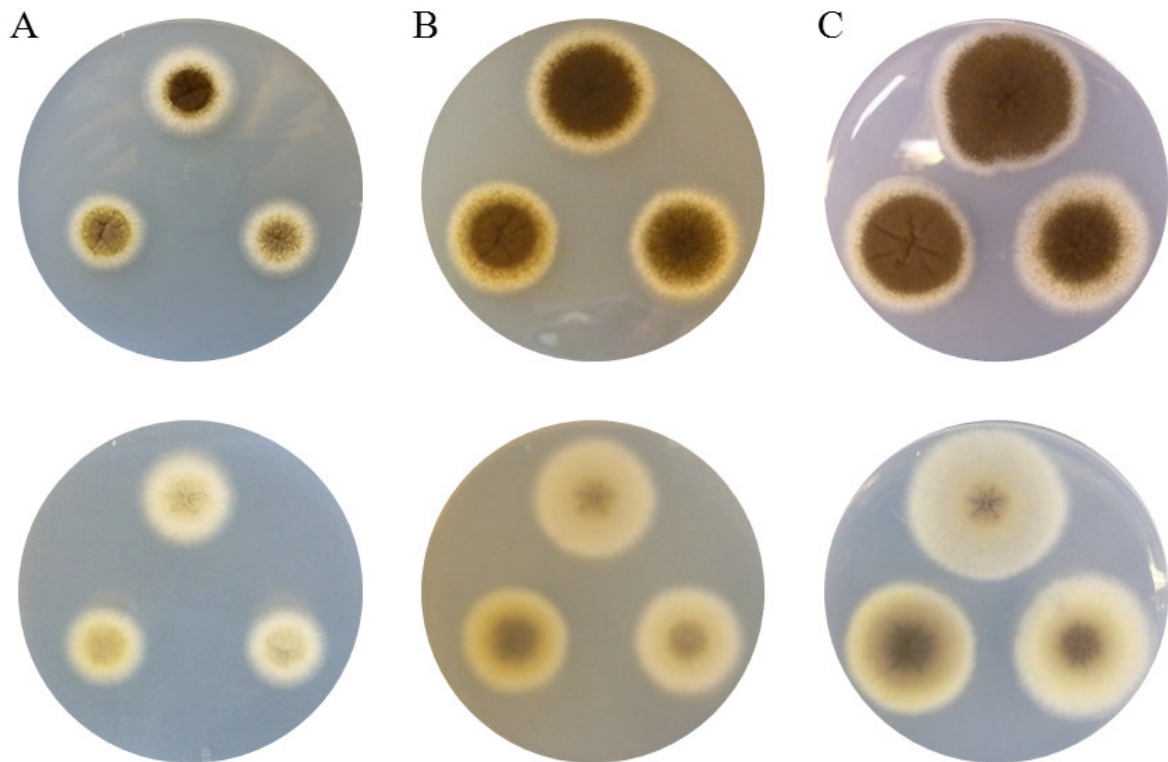


Abb. 3.37: Makroskopische Entwicklung der *ste7daAB*-Mutanten. Im Uhrzeigersinn AB1.13, *ste7daAB* (1) und *ste7daAB* (2) nach 48 (A), 72 (B) und 96 h (C). Obere Reihe: Aufsicht, untere Reihe: Bodenansicht.

terscheidbar. Neben der makroskopischen Untersuchung wurden die gebildete Konidienmenge, der Zeitpunkt der Konidienkeimung sowie das Hyphenwachstum der *ste7daAB*-Mutanten bestimmt.

Quantifizierung der gebildeten Konidienmenge

Die Konidienmenge wurde mit Hilfe radial wachsender Kolonien nach 48 h, 72 h und 96 h bestimmt. Das Animpfen und die Inkubation der Kulturen erfolgte identisch der Analyse des makroskopischen Phänotyps. Für *ste7daAB* (1) wurde eine Reduktion der Sporenmenge auf $12 \pm 3\%$ des Wildtyp-Niveaus festgestellt. Auch die *ste7daAB* (2)-Mutante zeigte eine Reduktion der gebildeten Sporenmenge, diese pendelte sich nach 72 h aber auf $40 \pm 8\%$ der AB1.13-Sporenmenge ein (Abb. 3.38). Somit hat die dauerhafte Aktivierung des MAKB-Signalweges, ebenso wie dessen Unterbrechung, einen negativen Einfluss auf die Konidienbildung in *A. niger*. Im Gegensatz zu den Ausschaltmutanten bleibt das Verhältnis der gebildeten Sporenmenge im Vergleich zum Wildtyp über die Zeit gesehen allerdings konstant. Somit kann davon ausgegangen

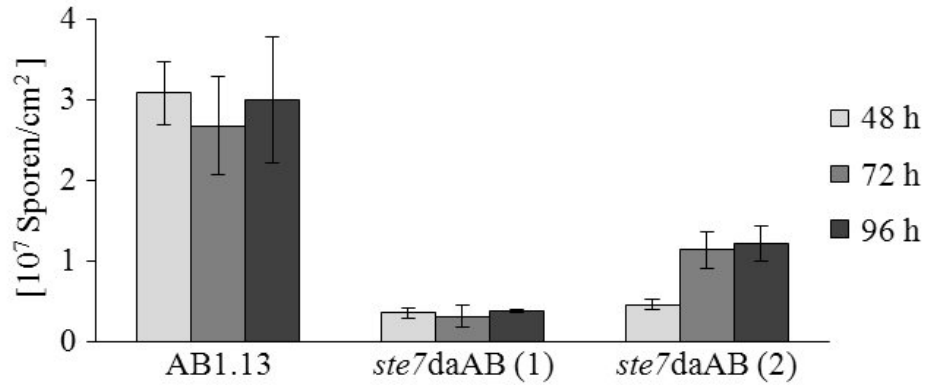


Abb. 3.38: Sporenmenge von AB1.13, *ste7daAB* (1) und *ste7daAB* (2) nach 48 h, 72 h und 96 h. Für die Quantifizierung wurden radial wachsende Kolonien vermessen und deren Konidienzahl ermittelt.

werden, dass die unterschiedlichen Mutationen der Ausschalt- bzw. dominant aktiven Mutanten die Sporenbildung auf verschiedene Weise beeinträchtigen.

Bestimmung des Keimungszeitpunkts von Konidien

Für die Analyse der Konidienkeimung von *ste7daAB* wurden 20-30 μ l Sporensuspension von Ab1.13 und den beiden dominant aktiven Mutanten auf Minimal-Medium getropft und für 6 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden mikroskopische Zufallsaufnahmen bei 40-facher Vergrößerung angefertigt. Die Analyse ergab keine Keimungsverzögerung der Sporen der Mutanten gegenüber den Wildtyp-Sporen. Somit hat die permanente Aktivierung des MAK-B-Signalwegs keine negativen Auswirkungen auf die Sporenkeimung in *A. niger*.

Die Hyphenwachstumsgeschwindigkeit

Für die Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit der Hyphen wurden 10 μ l (10^5 Sporen) mittig auf Minimal-Medium getropft und bei 37°C inkubiert. Nach 24 h und für die Dokumentation des Wachstums ab diesem Zeitpunkt alle weiteren 24 h, wurde die Myzelfront markiert.

Ste7daAB (1) zeigte ein um $6 \pm 2\%$ ($4,2 \pm 0,1$ mm) und *ste7daAB* (2) ein um $19 \pm 4\%$ ($3,7 \pm 0,2$ mm) reduziertes Wachstum gegenüber AB1.13. Somit zeigte *ste7daAB* (2) bei der Wachstumsgeschwindigkeit eine größere Abweichung vom Wildtyp als *ste7daAB* (1), wohingegen bei der makroskopischen Analyse und der Konidienbildung *ste7daAB* (1) die deutlicheren Auffälligkeiten aufwies.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die vermutlich variierende Expressionsstärke von dominant aktiven STE7 in den beiden Mutanten auf verschiedene Zellprozesse unterschiedlich auswirkt.

3.2.13 Die Konidiophorentwicklung erfolgt in *ste7daAB* früher als in AB1.13

Die Deletion von *makb* und *ste7* führte zur Unterbrechung des MAKB-MAP-Kinase-Signalweges. Eine Folge der Unterbrechung ist das deutlich spätere Einsetzen der Konidiophorentwicklung in den Ausschaltmutanten auf Standard-Minimal-Medium. Da der MAKB-Signalweg somit eindeutig an der Induktion der Konidiophorbildung beteiligt ist, besteht die Möglichkeit, dass eine dauerhafte Aktivierung von MAKB zu einer frühen Differenzierung des Myzels führt.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurden die Randbereiche fünf Tage alter, radial wachsender Kolonien von AB1.13, *ste7daAB* (1) und *ste7daAB* (2) mikroskopisch verglichen. Die ersten Konidiophore von AB1.13 zeigten einen Abstand von 3,3 mm zur Myzelfront, was den Ergebnissen der ersten Analyse der Konidiophorbildung radial wachsender Kolonien entsprach (Kap. 3.2.3 und Abb. 3.19). Bei einer Wachstumsgeschwindigkeit von 4,4 mm pro Tag (Abb. 3.24) entspricht dies einer zeitlichen Verzögerung von 18 h gegenüber der Myzelfront. Im Gegensatz dazu wiesen beide Mutanten mit $1,3 \pm 0,1$ mm einen deutlich geringeren Abstand zwischen den ersten Konidiophoren und der Myzelfront auf. Bei den gemessenen Wachstumsgeschwindigkeiten von ca. 4,2 bzw. 3,7 mm pro Tag entwickeln sich die ersten Konidiophore in den Mutanten demnach bereits in ca. 7 bis 8,5 h alten Hyphen (Abb. 3.39). Zu beachten ist in diesem Zusammenhang die Übersichtsaufnahme von *ste7daAB* (1) in Abbildung 3.39, die einen deutlich helleren, äußeren Konidiophorbereich im Vergleich zu AB1.13 und *ste7daAB* (2) aufweist. Dieser hellere Bereich führte bei der Auswertung des makroskopischen Phänotyps (Abb. 3.37) zu dem falschen Eindruck, dass der Abstand zwischen der Konidiophor- und Myzelfront in *ste7daAB* (1) vergrößert ist.

Folglich simuliert das mutierte *ste7* in den *ste7daAB*-Mutanten durch die dauerhafte Aktivierung des MAKB MAP-Kinase-Signalweges die Bedingungen, die im Wildtyp erst nach 18 Stunden erreicht werden und bewirkt dadurch eine frühere Induktion der Konidiophor- und Konidientwicklung.

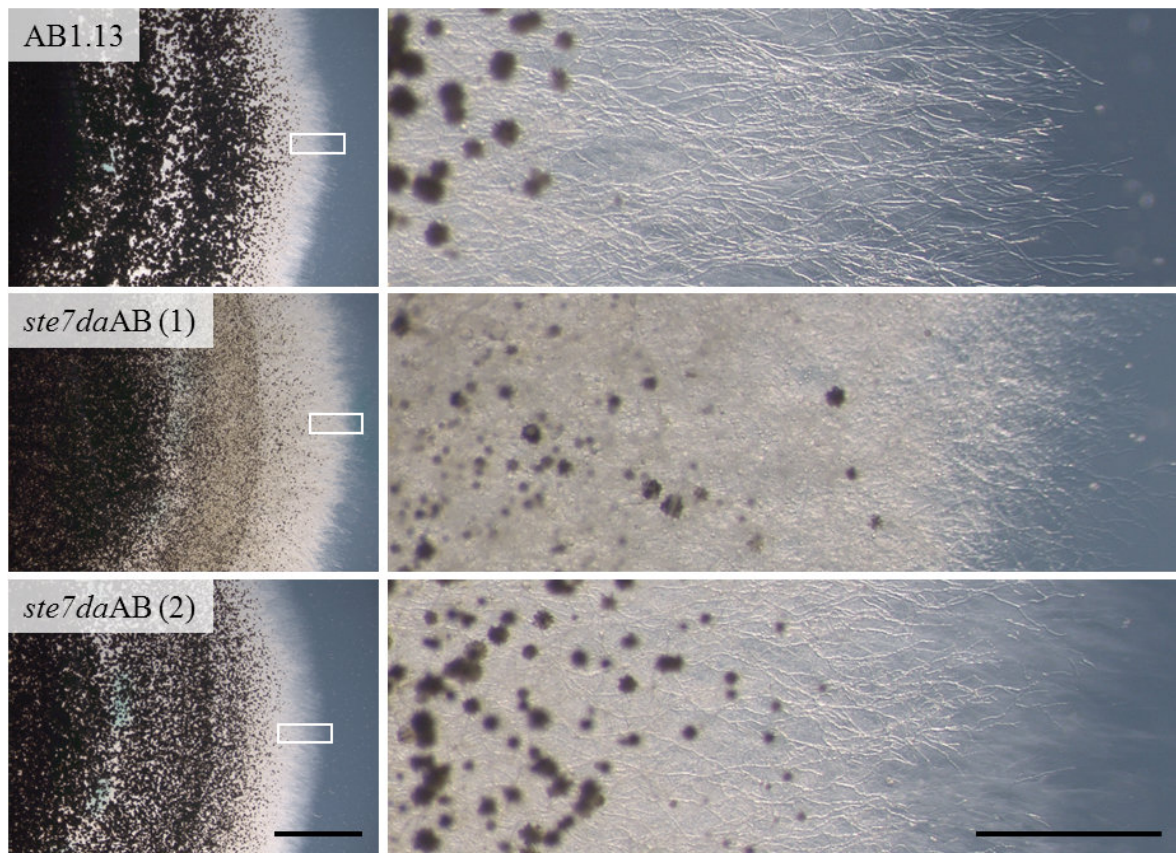


Abb. 3.39: Die Konidiophorentwicklung setzt in *ste7daAB* deutlich früher als in AB1.13 ein. Größenstandard: rechts 5 mm, links 1 mm.

3.2.14 Aktivierungsnachweis der Kinase MAKB.

Die Expression einer Kinase zu einem bestimmten Zeitpunkt lässt im Allgemeinen nur wenige Rückschlüsse auf ihre Aktivität zu. Daher hat sich für die Untersuchung der Aktivität von Kinasen die Western Blot-Analyse etabliert. Es ist allerdings nicht möglich die Aktivität von MAKB in AB1.13 zu analysieren, was in diesem Kapitel dargelegt wird.

Für die Untersuchung wurden zunächst Proteinextrakte von Flüssig- und Festmedium miteinander verglichen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass es zu keiner Expression von MAKB unter Kontrolle des nativen Promotors in Flüssigkultur kommt. Aus diesem Grund wurden Proteinextrakte von AB1.13 und $\Delta alb1$ AB Myzel von Festmedium angefertigt, wobei sich das erste Problem zeigte. Die Proben enthielten verschiedene Zellbestandteile, die sich nicht abtrennen ließen und den Extrakt dunkel färbten. Hier-

von waren vor allem die Extrakte der AB1.13 Kulturen betroffen, die vom Melanin vollständig schwarz gefärbt wurden (Abb. 3.40 A).

Dass diese unerwünschten Bestandteile der Extrakte ein Problem darstellten, zeigte sich nach dem Auftrennen der Proben in Polyacrylamid-Gelen. Während eine Coomassiefärbung bei Proteinextrakten aus Flüssigkulturen das erwartete Bandenmuster hervorbrachte, war in den Proben von Festmedium nur ein schwacher Schmier sichtbar (Abb. 3.40 B), was auf eine Degeneration der Proteine hindeutete.

Das Hauptproblem, das zur Einstellung der Experimente führte, war die Detektion der MAP-Kinase mit dem humanen Antikörper p44/42. Der Antikörper erkennt das Motiv TEY, wenn sowohl Threonin als auch Tyrosin phosphoryliert sind. Da dieses Motiv stark konserviert ist, ist die Verwendung des Antikörpers in vielen Organismen seit langem etabliert, wobei in Allgemeinen zwei Kinasen, die 55 kDa schwere MAP-Kinase MAKa (Erk1) und die 41 kDa schwere MAP-Kinase MAKb (Erk2) erkannt werden. In *A. niger* erkennt der Antikörper allerdings noch weitere, unbekannte Proteine, von denen mindestens eines rund 40 kDa schwer ist, in Flüssigkultur exprimiert wird und nicht MAKb sein kann (Abb. 3.40 C). Die letzte Annahme beruht auf Ergebnissen von Immunoblots mit Proteinextrakten aus Flüssigkulturen u.a. von $\Delta makbAB$ und *makb-gfpAB*.

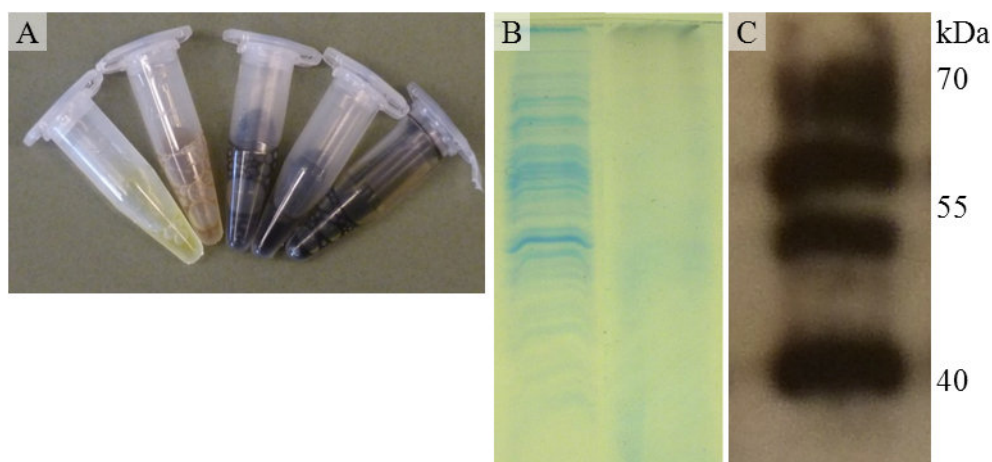


Abb. 3.40: Versuch eines Aktivitätsnachweises für MAKb.

A: Proteinextrakte von Kulturen (von links) aus Flüssigmedium, von $\Delta alb1AB$ und AB1.13 (3x). B: Coomassie-Färbung eines Polyacrylamid-Gel, linke Bande: Flüssigkultur-Proteinextrakt, rechte Bande: Festkultur-Proteinextrakt. C: Immunoblot mit dem Antikörper p44/42 eines Proteinextrakts von $\Delta makbAB$ kultiviert im Flüssigmedium. Erwartet wurde eine Bande bei 55 kDa (MAKa), nicht aber eine Bande bei 41 kDa (MAKb).

3.2.15 MAKB ist an der Regulierung der Sekretion von Sekundärmetaboliten beteiligt

Die Sekretion von dunklen Pigmenten durch $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ auf Festmedium führte zu der Frage, welche Bedeutung MAKB bei der Regulierung der Expression von Sekundärmetaboliten zukommt. Für orthologe Kinasen anderer Aspergillen wurde bereits eine regulierende Funktion bei der Expression der unterschiedlichsten Sekundärmetabolite nachgewiesen.

Die Analyse des Einfluss von MAKB auf die Expression von Sekundärmetaboliten erfolgte dabei auf zwei unterschiedlichen Wegen. Zum einen wurden die Sekretionsbedingungen der bereits erwähnten, optisch wahrnehmbaren Pigmente untersucht, zum anderen die Freisetzung volatiler Stoffe analysiert. Zu der letzteren Analyse kam es, da die Ausschaltmutanten einen leicht wahrnehmbaren, außergewöhnlich starken Humusgeruch aufwiesen. Die Untersuchungen der flüchtigen Stoffe erfolgten durch die Arbeitsgruppe Dickschat aus dem Institut für Organische Chemie.

Der Einfluss von MAKB auf die Sekretion von dunklen Pigmenten ins Medium erfolgte in stehenden Kulturröhrchen mit Flüssigmedium. Da sich bereits in früheren Experimenten ein Zusammenhang zwischen der Sporenbildung und der Sekretion der Pigmente aufzeigte und die Sporenbildung in den Mutanten nährstoffabhängig induziert wird, wurde das Experiment mit unterschiedlichen Zuckerkonzentrationen durchgeführt. Die Flüssigkultur ermöglicht dabei die Diffusion der Pigmente und somit eine Vergleichbarkeit der Sekretionsmenge zwischen den verschiedenen Proben.

Für den Versuch wurden 5 ml Minimal-Medium mit Glukosekonzentrationen von 0,0125 bis 3,2 M eingestellt und mit 10^6 Sporen pro ml von AB1.13, $\Delta makbAB$ bzw. $\Delta ste7AB$ beimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37°C stehend in völliger Dunkelheit. Nach mehr-tägiger Inkubation zeigte das AB1.13 Myzel mit steigender Glukosekonzentration eine Zunahme an Biomasse. Auch eine Sporenbildung war in allen Wildtypproben erkennbar. Die Sekretion einer dunklen Substanz ins Medium fand dagegen nicht statt.

Die Biomassebildung beider Ausschaltmutanten war mit der des Wildtyps vergleichbar. Wie bereits beschrieben, fand in den Mutanten im Gegensatz zum Wildtyp keine Sporenbildung bei Glukosekonzentrationen über 0,8 M statt (Kap. 3.28). In der 0,8 M Probe und allen Proben mit einer geringeren Glukosekonzentration konnte dagegen eine Sporenbildung festgestellt werden. Im Medium von $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ mit

einer Anfangskonzentration von 0,0125 bis 0,4 M Glukose konnte darüber hinaus eine deutliche Dunkelfärbung festgestellt werden, welche mit steigender Nährstoffversorgung an Intensität zunahm. Die Probe mit 0,8 M Glukose wies, obwohl sie sporulierte, keine Trübung auf, genauso wie das Medium der nicht-sporulierenden Kulturen. Die Trübung des Mediums scheint demnach von der Induktion der Sporenbildung abhängig zu sein. Bereits während der allgemeinen Laborarbeit mit den Ausschaltmutanten konnte olfaktorisch eine Veränderungen der Sekretion von volatilen Stoffen in den Mutanten wahrgenommen werden. Für die Analyse dieser Verbindungen wurden vollständig sporulierte Kulturen von AB1.13 und $\Delta makbAB$ verwendet. Die Inkubation erfolgte auf festem Minimal-Medium unter Standardbedingungen für vier bis acht Tage. Die Untersuchung bestätigte die bereits wahrgenommenen Unterschiede zwischen beiden Stämmen. So gibt $\Delta makbAB$ deutlich mehr Geosmin-Vorläufer an seine Umgebung ab als AB1.13. Geosmine sind bizyklische Alkohole und verantwortlich für den modrigen Geruch feuchter Erde. Im Gegensatz zu ihren Vorläufern konnten diese selbst aber nicht in der Analyse detektiert werden.

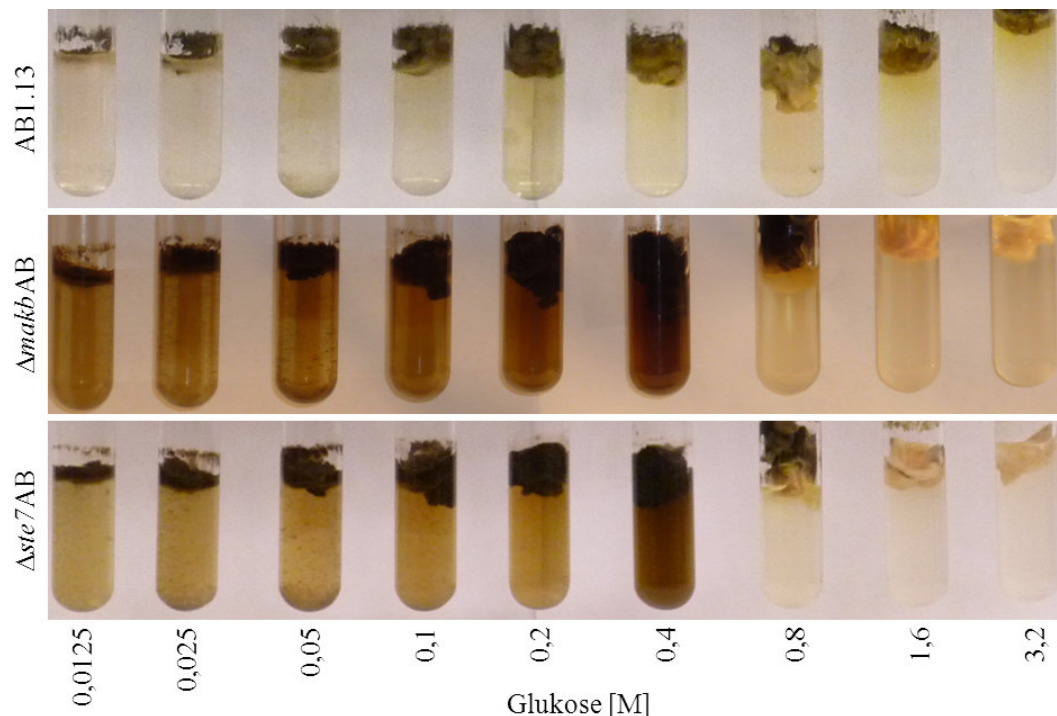


Abb. 3.41: $\Delta makb$ und $\Delta ste7$ sekretieren nährstoffabhängig eine dunkle Substanz ins Medium Die Proben wurden 20 Tage bei 37°C inkubiert. AB1.13 bildet unabhängig von der Nährstoffversorgung Sporen, sekretiert aber keine dunkle Substanz ins Medium. Dagegen sekretieren beide Ausschaltmutanten leicht zeitversetzt (s. 0,8 M Glukose) zur Sporenbildung eine dunkle Substanz ins Medium.

4 Diskussion

4.1 Beitrag der Oberfläche von *Aspergillus niger* Konidien zur Pelletmorphologie in Flüssigkultur

Warum das *alb1*-Gen?

Eine maximale Ausbeute steht im Vordergrund biotechnologischer Prozesse, und es ist bekannt, dass diese maßgeblich von der Pilzmorphologie beeinflusst wird (Grimm *et al.* 2005a). In dieser Arbeit haben wir den Einfluss der primären Sporeninteraktion auf die finale Pelletmorphologie in *A. niger*-Flüssigkultur betrachtet, wofür wir die Sporen-Oberflächeneigenschaften durch das Entfernen von Melanin manipulierten. Die eigentliche Aufgabe von Melanin ist der Schutz der Sporen vor schädlichen äußeren Einflüssen wie UV-Strahlung oder chemisch aktiven Substanzen. Im Gegensatz zu vielen anderen filamentösen Pilzen ist Melanin in *A. niger* ein exklusiver Bestandteil der äußeren Konidienhülle und wird daher ausschließlich während der Konidiogenese synthetisiert (Tsukahara 1968, Calvo *et al.* 2002). Eine Unterbrechung der Biosynthese von Melanin sollte daher keinen Einfluss auf die vegetative Entwicklung des Pilzes haben, da die an dieser Synthese beteiligten Proteine nur während der Sporenbildung exprimiert werden. Mit Hilfe von Blast-Analysen mit den bekannten Sequenzen des *wa*-Gens aus *A. nidulans* (Mayorga und Timberlake 1990) und von *pksP* aus *A. fumigatus* (Tsai *et al.* 1998, Langfelder *et al.* 1998) wurde das Gen An09g05730 identifiziert und *alb1* genannt. Das entsprechende Protein weist mit einer β -Ketotransferase-, Acyltransferase-, Acyl-Carrier-Protein- und Thioesterase-Domänen alle typischen Domänen der an der Melanin-Biosynthese beteiligten Polyketidsynthase auf.

Die *alb1* Deletionsmutanten zeigen eine veränderte Konidien-Pigmentierung und Morphologie

Das Ausschalten des *alb1*-Gens in *A. niger* führte zum Verlust der namensgebenden Schwarzfärbung der Konidiosporen. Die dunkle Färbung wird von Melanin, einer nicht vollständig definierten Verbindung, die aus spontan reagierenden Chinonen gebildet wird, verursacht. Somit ist davon auszugehen, dass die von *alb1* kodierte Polyketidsyn-

thase an der Bildung der Vorläufer der Chinone beteiligt ist. Die Beobachtungen sind vergleichbar mit den Ergebnissen der Ausschaltung der orthologen Polyketidsynthasen in *A. fumigatus* und *A. nidulans* (Langfelder *et al.* 1998, Tsai *et al.* 1998, Mayorga und Timberlake 1990). Interessanterweise zeigen sich bei der Oberflächenmorphologie der Sporen deutliche Unterschiede zwischen den Albino-Stämmen der unterschiedlichen Arten. Rasterelektronenmikroskopieaufnahmen von Wildtyp-Konidien offenbaren bei allen drei Aspergillen eine raue Oberfläche mit deutlich ausgeprägten Strukturen. Demgegenüber ist die Oberfläche der *A. fumigatus* Albino-Sporen glatt und weist keine erkennbare Strukturierung auf (Tsai *et al.* 1998, Jahn *et al.* 2000, Pihet *et al.* 2009). *A. nidulans* Albino-Konidien besitzen dagegen weiterhin die rauen Strukturen der Wildtyp-Konidien und sind von diesen elektronenmikroskopisch nicht unterscheidbar (Jahn *et al.* 2000). Aus diesen widersprüchlichen Ergebnissen ergab sich die Frage, ob die Deletion von *alb1* in *A. niger* morphologische Unterschiede der Sporenoberfläche im Vergleich zu Wildtyp-Sporen bewirkt und ob dies auf das Fehlen von Melanin oder auf davon unabhängige, weitere Funktionen von ALB1 zurückzuführen ist? Die Ergebnisse zeigen, dass die *A. niger* Albino-Sporen eine glatte Oberfläche, vergleichbar mit der der *A. fumigatus* Albino-Sporen, aufweisen. Dass Melanin an der Ausbildung der deutlichen Strukturierung der Sporenoberfläche beteiligt ist, wurde auch durch das chemische Entfernen des Melanins in Wildtyp-Sporen bestätigt. Die behandelten Sporen wiesen, wie auch die Albino-Sporen, eine ebene, unstrukturierte Oberfläche auf (A. Wagenau, persönliche Mitteilung). Eine weitere Bestätigung dieser Beobachtung erfolgte in *A. fumigatus* durch die Zugabe von Pyroquilon zum Kulturmedium der untersuchten Pilze. Die Substanz inhibiert in *A. fumigatus* spezifisch die Hydroxynaphthalen-Reduktase ARP2, die ebenfalls an der DHN-Melanin-Biosynthese beteiligt ist. Im Ergebnis werden von Kulturen auf diesem Medium, unabhängig von der Polyketidsynthase PksP, Albino-Sporen mit glatten Oberflächen gebildet (Pihet *et al.* 2009). Die Annahme liegt daher nahe, dass die Effekte direkt durch das Fehlen von Melanin und nicht durch Sekundärfunktionen von ALB1 ausgelöst werden. Folglich kann bei der Gestaltung der Konidienoberfläche davon ausgegangen werden, dass Melanin auch strukturelle Aufgaben übernimmt und das Fehlen von Melanin somit Sekundäreffekte auslösen kann. So scheint die Anwesenheit von Melanin z.B. für den räumlichen Aufbau und den Erhalt der rauen Struktur der Sporenoberfläche von *A. fumigatus* essentiell zu sein (Pihet *et*

al. 2009). Inwiefern Melanin einen Einfluss auf die Gestaltung der Konidienoberflächen von *A. niger* hat, wurde mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen untersucht.

Alle Aspergillus-Konidien werden von mehreren schützenden Schichten umgeben, wobei die äußerste u.a. aus stäbchenförmigen Hydrophobinen (Girardin *et al.* 1999), Melanin und den formgebenden Lamininen bestehen. Die Laminine konzentrieren sich vor allem in Vorsprüngen der äußersten Hülle, wobei sie die für die Wildtyp-Sporen typischen rauhen Oberflächenstruktur erzeugen (Tronchin *et al.* 1993, Tronchin *et al.* 1997).

Für *A. fumigatus* konnte gezeigt werden, dass die Unterbrechung der Melanin-Biosynthese mit einer inkorrekten Ausbildung bzw. dem vollständigen Verlust der äußersten hydrophobinhaltigen Hülle einhergeht. Somit ist Melanin ein essentieller und strukturgebender Faktor bei der Erzeugung und Gestaltung dieser Konidienhülle. Der Verlust der rauhen Oberflächenstruktur der Albino-Sporen wird somit nur indirekt durch die Abwesenheit von Melanin verursacht, da Melanin nur die Basis für die Einlagerung der Laminine darstellt. Entsprechend können die widersprüchlichen Ergebnisse der Albino-Konidienoberfläche von *A. nidulans* und *A. fumigatus* bzw. *A. niger* auch auf der Fähigkeit von *A. nidulans* beruhen, Laminine in Abwesenheit von Melanin in der zu diesem Zeitpunkt äußersten Hülle zu integrieren.

Oberflächenladung und Zeta Potential

Das elektrostatische Oberflächenpotential von Pilzsporen wird im Allgemeinen als ein mögliches Kriterium für die Beeinflussung der Sporenagglomeration in Flüssigkultur gesehen. *A. niger* Sporen weisen dabei in einem weiten pH-Bereich eine negative Oberflächenladung auf, woran auch das zumeist negativ geladene Melanin einen signifikanten Anteil leistet (Nosanchuk und Casadevall 1997, Wargenau *et al.* 2011). Der Beitrag von Melanin zu der Oberflächenladung wurde ebenfalls durch die Messung des Zeta-Potentials von Albino-Sporen bekräftigt. In einem weiten pH-Spektrum wiesen diese deutlich positivere Ladungen als die Wildtyp-Sporen auf. Diese Beobachtung wurde auch mit der *A. fumigatus* Albino-Mutante bestätigt, deren Konidien eine deutlich geringere negative Nettoladung als die Wildtyp-Sporen aufweisen (Pihet *et al.* 2009).

Es wird angenommen, dass die Oberflächenladung einen negativen Beitrag zur Sporenagglomeration leistet. Dieser beruht auf den elektrostatischen Abstoßungskräften, wie sie zwischen gleichgeladenen Teilchen auftreten. Bei ungeladenen Teilchen treten diese Kräfte entsprechend nicht auf. Die Abstoßungskräfte korrelieren dabei direkt mit den

Nettoladungen der Konidien, weswegen bereits mehrfach versucht wurde, die Aggregationsstärke von Sporen mit unterschiedlichen Nettoladungen zu korrelieren. Allerdings konnte bei keinem dieser Versuche ein eindeutiger Beitrag der Nettoladung zum Aggregationsverhalten der Sporen nachgewiesen werden (Seviour und Read 1985, Dynesen und Nielsen 2003, Grimm *et al.* 2005a).

Für unsere Analyse wählten wir die pH-Werte 2,0 bzw. 3,5, da sich bei diesen Werten die Eigenschaften der Oberflächenladung der beiden Stämme jeweils maximal unterscheiden, wenngleich vor allem bei pH 2,0 die Keimung der Sporen erheblich beeinträchtigt wird. Unsere Ergebnisse führten zu der Schlussfolgerung, dass eine positiv oder negativ Oberflächenladung der Agglomeration von Partikeln entgegenwirkt und somit die primäre Sporenagglomeration verschlechtert. Dies steht in Widerspruch zu den bisherigen Beobachtungen, die keinen Einfluss der Oberflächenladung auf das Agglomerationsverhalten der Konidien nachweisen konnten. Eine mögliche Ursache, warum es bisher nicht gelang eine Korrelation zwischen der Oberflächenladung und dem Agglomerationsverhalten der Konidien nachzuweisen, liegt möglicherweise in nicht ausreichend an die Fragestellung angepassten Inkubationsbedingungen begründet. Dabei ist möglicherweise der pH-Wert von entscheidender Bedeutung, da z.B. bei einem pH-Wert von 5,5 kein Unterschied zwischen dem Agglomerationsverhalten der Albino- und der Wildtyp-Sporen erkennbar war.

Beitrag von Melanin zur Hydrophobizität von Konidien und Auswirkung auf Hydrophobine

Melanine werden zum einen als hydrophobe Substanzen beschrieben (Hill 1992, Gómez und Nosanchuk 2003). Sie besitzen aber auch unterschiedliche funktionelle Gruppen, z.B. Carboxylgruppen, die pH-Wert abhängig deprotoniert werden können, wodurch Melanin wasserlöslich wird (Wargenau *et al.* 2011). Entsprechend trägt Melanin, in Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen, nicht wesentlich zur Hydrophobizität von *A. niger* Sporen bei. Diesen Erwartungen entsprechend konnte mit zwei unabhängigen Experimenten keine Veränderung der Hydrophobizität zwischen den Albino- und den Wildtyp-Sporen festgestellt werden. Ähnliche Untersuchungen wurden auch mit der Albino-Mutante in *A. fumigatus* durchgeführt, wobei es zu widersprüchlichen Ergebnissen kam. Zum einen wurde der Beitrag von Melanin zur Hydrophobizität der Albino- und Wildtyp-Sporen mittels Benässbarkeitassays bestimmt. Bei diesen Un-

tersuchungen wurden verschiedene Substanzen getestet. Dabei konnte bei keiner der verwendeten Verbindungen ein Unterschied im Verhalten zwischen den Sporen der einzelnen Stämmen festgestellt werden (Tsai *et al.* 1998). Dem widersprechend zeigen die Ergebnisse von Pihet *et al.* (2009) eine deutliche Abnahme der Hydrophobizität der *A. fumigatus* Albino-Konidien, sowie eine entsprechend Zunahme der Benässbarkeit der Mutante.

Neben diesem direkten Beitrag von Melanin zur Hydrophobizität kann Melanin aufgrund der bereits beschriebenden strukturellen Aufgaben auch einen indirekten Einfluss auf die hydrophoben Eigenschaften der Sporen haben. So scheint es, dass im Gegensatz zu den Lamininen, die Hydrophobine in *A. fumigatus* und *A. niger* unabhängig vom Melanin immer in der Lage sind, sich auf der jeweils äußersten Hülle anzulagern. Anders ist der Widerspruch zwischen dem Verlust der melaninhaltigen Hülle und den Ergebnissen der Bestimmung der Hydrophobizität nicht zu erklären. Darüber hinaus konnte für die Hydrophobine dewA und rodA aus *A. nidulans* eine wichtige Rolle bei der Konidienadhäsion nachgewiesen werden (Dynesen und Nielsen 2003).

Pelletentwicklung

Durch das Verändern der Sporenoberfläche sowie das Anpassen des pH-Werts waren wir in der Lage, ein entgegengesetztes Agglomerationsverhalten der Wildtyp- und der Albino-Sporen bei pH 2,0 und 3,5 zu beobachten. Da die äußeren Sporenhüllen während der Keimung abgeworfen werden (Tsukahara 1968), sollte das Fehlen von Melanin keinen direkten Einfluss auf die weitere Pelletentwicklung haben und diese ausschließlich auf den Resultaten der primären Sporenagglomeration aufbauen. Entgegen aller Erwartungen zeigten sich bei der weiteren Pelletentwicklung keine Unterschiede zwischen AB1.13 und $\Delta alb1$ AB. Gerin *et al.* (1993) konnten in einer Studie mit dem Weißschimmel *Phanerochaete chrysosporium* zeigen, dass die Konzentration an Polysacchariden auf der Sporenoberfläche im Laufe der Keimung deutlich ansteigt. Da Polysaccharide relativ langgestreckte Verbindungen darstellen und nicht nur auf Konidenoberflächen sondern auch auf den Oberflächen von Keimlingen und Hyphen zu finden sind, stellte er die Vermutung auf, dass sich die ungeladenen Polysaccharide zweier Konidiophore umschlingen und dadurch die Aggregation zwischen Sporen oder Zellen induzieren können. Eine weitere Studie mit *A. fumigatus* bestätigt diese Beobachtungen. So gelangen α -1-3 Glucane, die ebenfalls zu den Polysacchariden gehören, durch Abstoßung

der äußeren Hülle an die Oberfläche der Konidien und sind dort nach Fontaine *et al.* (2010) allein für den weiteren Verlauf der Aggregation der Konidien verantwortlich. Auch unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die äußere Konidienhülle zwar die primäre Sporenagglomeration beeinflusst, diese Interaktion von ungekeimten Sporen aber keinerlei Einfluss auf die folgende Pelletentwicklung hat. Im Gegensatz zu dem momentan gültigen Modell der Pelletbildung wird deren endgültige Morphologie und -größe demnach grundlegend von später stattfindenden Interaktionen, wahrscheinlich der Polysaccharide, beeinflusst, die augenscheinlich in der Lage sind alle zuvor erfolgten Sporen-Agglomerationsdefizite auszugleichen. Die für die Pelletentwicklung relevanten Prozesse beginnen demnach erst mit der sekundären Sporenaggregation.

Biofilmbildung

Die Pelletbildung beruht auf der Interaktion und Zusammenlagerung von Sporen bzw. Hyphen. Im Gegensatz dazu wird die Biofilmbildung durch die Interaktion von Sporen mit fremden Oberflächen eingeleitet. Trotz dieser Unterschiede beruhen beide Prozesse auf den gleichen Grundprinzipien, der Interaktion und Anhaftung der Konidien bzw. Hyphen an einen anderen Körper. Die primäre Anlagerung der Konidien spielt bei der Biofilmbildung allerdings eine ungleich bedeutendere Rolle als bei der Pelletbildung, da sie den Sporen die Zeit verschafft, die sie benötigen um sich aktiv anzuheften. Für *A. niger* konnte bereits gezeigt werden, dass der initialen Anheftung der Konidien die Sekretion einer adhäsiven Matrix folgt. Diese extrazelluläre Matrix wirkt wie ein Kleber der Sporen bzw. Hyphen fest mit der Oberfläche verbindet (Villena und Gutiérrez-Correa 2007). Somit besteht die Biofilmbildung aus dem passiven Prozess der primären Sporenanlagerung und dem aktiven Prozess der dauerhaften Anheftung durch die Sekretion der extrazellulären Matrix.

Aufgrund der erkennbaren Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der Albino-Mutante bei der Fähigkeit Biofilme zu bilden, legen unsere Daten die Vermutung nahe, dass die Veränderung der äußeren Sporenhülle einen Einfluss auf die Sporenanlagerung hat. Ob die Veränderung der primären Sporenanlagerung dabei auf Sekundäreffekte, ausgelöst durch die strukturellen Änderungen der Oberflächenmorphologie, oder auf die veränderte Oberflächenladung zurückgeführt werden kann, ist dabei schwer zu beurteilen.

Im Gegensatz dazu kann als sicher angesehen werden, dass zumindest ein Teil der

primären Interaktionen von Sporen durch hydrophobe Wechselwirkungen beeinflusst werden. So erfolgt z.B. die Anhaftung vieler Pflanzenpathogene durch die Interaktion ihrer Hydrophobine mit hydrophoben Bereichen der Oberfläche ihrer Wirte (Wösten 2001). Auch die Biofilmbildung in unseren Untersuchungen erfolgte auf hydrophoben Polystyroloberflächen. Somit spielen neben den durch das Entfernen von Melanin ausgelösten Veränderungen auch hydrophobe Wechselwirkungen für die ersten Interaktionen zwischen Sporen und Oberflächen eine Rolle, was den, z.T. sehr geringen Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp in der Fähigkeit einen Biofilm zu bilden, erklären könnte.

Zusätzlich zu den hydrophoben Wechselwirkungen haben auch Glykoproteine eine wichtige Funktion bei der Biofilmbildung. So konnte mit Konidien von *Colletotrichum lindemuthianum* gezeigt werden, dass Glykoproteine essentiell für die Anhaftung der Sporen an Polystyrol-Oberflächen sind (Hughes *et al.* 1999). Dabei ist deren Beitrag für die Adhäsion von Konidien an Polystyrol z.T. deutlich stärker zu gewichten, als der Beitrag der Hydrophobine, wie u.a. mit Konidien von *P. chrysosporium* gezeigt werden konnte (Gerin *et al.* 1993). In ruhenden Wildtyp-Sporen werden die Glykoproteine, wie auch die Polysaccharide, von der äußeren Konidienhülle verdeckt und erst durch deren Abstoßung im Vorfeld der Keimung freigelegt (Fontaine *et al.* 2010). Es besteht daher auch die Möglichkeit, dass aufgrund der reduzierten äußeren Hülle der Albino-Mutanten deren Glykoproteine früher bei der Sporenanhaftung an Polystyrol mitwirken können, als dies im Wildtyp der Fall ist und dadurch die verbesserte Sporenanhaftung erreicht wird.

Auch das Abstoßen der äußeren Konidienhülle im Laufe der Keimung kann einen negativen Einfluss auf die Anhaftung der Sporen an die Polystyroloberfläche haben, da dabei die Konidien möglicherweise die Verbindung zur Oberfläche verlieren. Auch in diesem Fall hätte der Wildtyp mit seiner ausgeprägteren äußeren Hülle einen Nachteil gegenüber der Albino-Mutante.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die primäre Anlagerung essentiell für die Biofilmbildung ist, da sie die Voraussetzungen für alle späteren Anheftungen der Keimschläuche und Hyphen bildet. Schlägt die Anhaftung der Sporen dagegen fehl, verbleiben die Sporen und die sich später bildenden Keimlinge und Hyphen freischwimmend im Medium und es kommt zur Pellet-, nicht aber zur Biofilmbildung.

Produktivität in Flüssigkultur

Durch die Modifizierung der äußeren Konidienhülle der Albino-Mutante konnten keinerlei Veränderungen der endgültigen Morphologie der Pellets gegenüber dem Wildtyp erreicht werden. Entsprechend waren unter identischen Kultivierungsbedingungen keine Unterschiede in der Produktivität zwischen den beiden Stämmen messbar. Dagegen war ein Vergleich der Produktivität zwischen Biofilmen und Pellets unter identischen Ausgangsbedingungen möglich, wobei eine um bis zu neunmal höhere Glucoamylaseaktivität im Überstand der Biofilme gemessen werden konnte. Bestätigt werden diese Ergebnisse durch frühere Studien, in denen eine Steigerung der Zellulase-, β -Glukosidase-, Endoglukanase- und Xylanaseproduktion von *A. niger* Biofilmen gegenüber Pelletkultivierungen beschrieben wurde. Für die Entwicklung der Biofilme wurden bei diesen Versuchen keine glatte Oberflächen, sondern Polyesterfasern, die im Laufe der Kultivierung von dem Myzel umwachsen wurden, verwendet (Gutiérrez-Correa und Villena 2003, Villena und Gutiérrez-Correa 2006, Villena und Gutiérrez-Correa 2007).

Die Beobachtungen legen nahe, dass filamentöse Pilze, die als Biofilme kultiviert werden, eine signifikant höhere Ausbeute gegenüber Pelletkultivierungen ermöglichen.

Ursächlich für diese Steigerung können dabei zwei Effekte sein. Zum einen zeichnen sich Pellets, abhängig von der Rührgeschwindigkeit, durch sehr kompakt aneinander liegende Hyphen aus, wodurch der Bereich mit dem die Hyphen mit dem Kulturmedium interagieren können, als annähernd identisch mit der Kugeloberfläche des Pellets angesehen werden kann. Aufgrund eines deutlich lockereren Wachstums haben die Hyphen in Biofilmen dagegen eine deutlich größere Zelloberfläche zur Interaktion mit dem Kulturmedium zur Verfügung, was sich in einem relativ großen, stoffwechselaktiven Bereich widerspiegelt. Der zweite Punkt ist auf mechanischen Stress zurückzuführen. So kommt es bei der Pelletkultivierung zu Interaktionen der Pellets untereinander und mit der Reaktorwand, wodurch einzelne, aus dem Pellet herauswachsende Hyphen enormen Kräften ausgesetzt und dadurch beschädigt oder abgerissen werden. Aus diesem Grund müssen die Hyphen während einer Pelletkultivierung zum einen permanent ihre Septen schließen, um ein Auslaufen des Zytoplasmas zu verhindern, zum anderen wird ein erheblicher Teil der ihnen zu Verfügung stehenden Energie für die Reparatur der Hyphen aufgewandt. Des Weiteren werden Enzyme vor allem an der Hyphenspitze sekretiert (Gordon *et al.* 2000, Taheri-Talesh *et al.* 2008), sodass es neben dem Ener-

gieverbrauch auch noch zu einer Unterbrechung der Sekretion der Zielenzyme kommen kann. Während einer Biofilmkultivierung werden die Hyphen keinen solchen mechanischen Kräften ausgesetzt, sodass zum einen die Energie für die Reparatur der Hyphen gespart, zum anderen die Sekretion der Zielprodukte nicht unterbrochen wird.

Die Produktion von Enzymen und chemischen Verbindungen mit Hilfe von *A. niger* Biofilmen könnte daher eine Strategie zur Optimierung von biotechnologischen Prozessen darstellen.

Abschließend können aus diesem Teil der Arbeit drei Erkenntnisse abgeleitet werden: Erstens hat die primäre Sporenagglomeration keinen Einfluss auf die endgültige Pelletmorphologie von *A. niger*. Zweitens haften *A. niger* Albino-Konidien besser an Polysterol-Oberflächen und bilden somit besser Biofilme als Wildtyp-Konidien und drittens weisen Proben aus Biofilmkultivierungen eine erheblich höhere Glucoamylaseaktivität als Proben aus Pelletkultivierungen auf.

4.2 Aufgaben der mitogen-aktivierten Proteinkinase

MAKB in *Aspergillus niger*

Die Deletionsmutanten des *makb*-Signalwegs zeigen einen pleiotrophen Phänotyp sowohl bei der Keimung, der vegetativen Entwicklung, als auch während der asexuellen Vermehrung von *A. niger*. Die Ausschaltmutanten von $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ wurden für die Untersuchungen mit dem Wildtyp AB1.13 sowie den komplementierten Ausschaltmutanten bezüglich Konidienmorphologie und hydrophobe Eigenschaften, Keimungsgeschwindigkeit, Hyphenwachstum, Konidiophormorphologie, Sporulation, dem makroskopischen Erscheinungsbild sowie auf mögliche Auswirkungen auf die Pelletentwicklung in Flüssigkultur und die Regulation von Sekundärmetaboliten hin verglichen.

Konidienmorphologie und hydrophobe Eigenschaften

Die Morphologie der Sporen wurde mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie zwischen den Stämmen $\Delta makbAB$ und AB1.13 verglichen. Die Sporen beider Stämme wiesen bei der Probenvorbereitung eine vergleichbare Dunkelfärbung durch Anlagerung von Melanin auf. Auch während der mikroskopischen Untersuchung der Sporenoberflächen

reifer Sporen offenbarte sich kein Unterschied zwischen den Stämmen. Entsprechend kann davon ausgegangen werden, dass die MAP-Kinase MAKB keine essentielle Funktion bei der Sporenbildung einnimmt oder Auswirkungen auf deren morphologisches Erscheinungsbild hat. Allerdings lagen in den Proben der Ausschaltmutante eine große Anzahl unreifer Sporen mit glatten Oberflächen vor. Für die Untersuchungen wurden Sporen von vier Tage alten Kolonien verwendet. Da die Sporenbildung unter den gewählten Bedingungen auch bei den Mutanten bereits nach zwei Tagen einsetzt, kann davon ausgegangen werden, dass die große Anzahl an unreifen Sporen von $\Delta makbAB$ zumindest nicht allein auf die verzögert einsetzende Sporulation zurückzuführen ist. Es wird daher vermutet, dass der von Sewall (1990) beschriebene Reifungsprozess in den Sporen der Ausschaltmutanten langsamer abläuft.

Die Überprüfung der Hydrophobizität der Sporen mit dem Benässbarkeitsassay ergab ebenfalls keine Unterschiede zwischen AB1.13 und $\Delta makbAB$, was z.T. mit der Beschreibung entsprechender Ausschaltmutanten in *T. virens* (Kumar *et al.* 2010) übereinstimmt. Den Ergebnissen folgend scheint die MAP-Kinase somit keinen Einfluss auf die Sporenmorphologie sowie deren hydrophobe Eigenschaften in *A. niger* zu haben. Die verlangsamte Reifung, die am deutlichsten durch die verminderte Strukturierung der Sporenoberfläche, vermutlich verursacht durch eine verzögerte Einlagerung der strukturgebenden Laminine (Tronchin *et al.* 1993), muss dabei nicht direkt durch die *makb*- bzw. *ste7*-Ausschaltung verursacht werden. Sie kann auch ein Sekundäreffekt der schlechteren Nährstoff- und Energieversorgung während der Sporulation sein (s.u.).

Keimung und Wachstumsgeschwindigkeit von Keimlingen

Die Keimung der Ausschaltmutanten $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ tritt verzögert gegenüber den Vergleichsstämmen ein. Die Ursache für diese Verzögerung ist schwer einzugrenzen, sie ist vermutlich aber nicht in der langsameren Reifung der Konidien der Ausschaltmutanten zu suchen, da auch bei Sporen mit einer längeren Reifezeit dieser Effekt zu beobachten war. Obwohl sich die äußere Morphologie der Sporen von $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ nicht vom Wildtyp unterscheidet, kann dennoch eine allgemein schlechtere Konidienqualität für die verzögerte Keimung der Sporen verantwortlich sein. Der Grund kann dabei entweder bei der Konidienbildung oder in einer Funktion der Kinasen während der Keimung begründet liegen.

Für die Ausschaltung der orthologen Kinase in *A. nidulans* konnte möglicherweise ein

ähnlicher Effekt beobachtet werden (Jun *et al.* 2011). Für die Untersuchungen wurden Konidien auf Festmedium vereinzelt und nach 17 Stunden der Radius des sich bildenden Myzels bestimmt. Dieser fiel bei $\Delta mpkB$ -Stämmen signifikant geringer aus als beim Wildtyp, woraus allerdings geschlossen wurde, dass die Hyphenwachstumsgeschwindigkeit der Keimlinge bzw. des Myzels der Mutante geringer ist als beim Wildtyp. Eine alternative Erklärung für diese Beobachtung wäre die verzögerte Keimung der Sporen, wodurch die Keimlinge und Hyphen der Mutante weniger Wachstumszeit hätten, was ebenfalls den signifikant geringeren Durchmesser der Kolonie erklären würde. Eine separate Überprüfung des Keimungszeitpunkts ist in der Veröffentlichung nicht dokumentiert (Jun *et al.* 2011). Die Annahme der Autoren, dass der Keimungszeitpunkt der Konidien der Mutante nicht beeinträchtigt ist, beruht womöglich auf den Ergebnissen der Ausschaltung des Gens der orthologen Kinase MAK-2 in *N. crassa*. Für diese konnte keine Verschiebung des Einsetzens der Keimung, wohl aber eine Ausweitung des Zeitraums, in dem die Sporen keimen, im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Darüber hinaus zeigten die $\Delta mak-2$ Keimlinge ein deutlich verlangsamtes Wachstum der Keimschläuche (Pandey *et al.* 2004).

Die Wachstumsgeschwindigkeit der Keimlinge konnte in *A. niger* nicht quantifiziert werden. Zu Zeitpunkten, zu denen zwischen dem Wildtyp bzw. den Mutanten vergleichbare Keimraten vorlagen, schwankte die Keimlingslänge in allen Proben zwischen einigen wenigen und bis zu 50 μm , sodass der sich ergebende Fehler jegliche Auswertung erübrigte. Von der Quantifizierung abgesehen, konnten allerdings keine auffälligen Defizite bei der Wachstumsgeschwindigkeit der Keimlinge der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden.

Hyphenwachstum

Bestätigt werden konnte dagegen, dass die allgemeine Hyphenwachstumsgeschwindigkeit von $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ signifikant gegenüber dem Wildtyp reduziert ist. Ein hierzu identisches Verhalten zeigt der $\Delta mpkB$ -Stamm aus *A. nidulans*. Aus dem reduzierten Hyphenwachstum wurde dabei die Schlussfolgerung gezogen, dass MpkB an einer für die Hyphenverlängerung wichtigen Signalweiterleitung beteiligt ist (Jun *et al.* 2011). Die Vermutung wird vor allem damit begründet, dass die mit MpkB eng verwandte, paraloge MAP-Kinase MpkA ebenfalls einen Effekt auf das Hyphenwachstum hat (Bussink und Osmani 1999). Der endgültige Nachweis für diese Theorie steht

allerdings noch aus. Identische Effekte konnten darüber hinaus auch in Stämmen orthologer Ausschaltungen von *T. virens* (Mukherjee *et al.* 2003) oder *N. crassa* (Pandey *et al.* 2004) beobachtet werden.

Es ist bekannt, dass die Kinase MAK-2 in *N. crassa* an der Fusion von Keimlingen und Hyphen während des vegetativen Lebenszyklus beteiligt ist. Auch für *A. nidulans* wurde eine essentielle Bedeutung des orthologen Signalwegs für die Hyphenfusion beschrieben (Wei *et al.* 2003). In *A. niger* wurden dagegen Fusionsereignisse zwischen Hyphen bisher nicht direkt beschrieben. Aufgrund seiner Fähigkeit zur parasexuellen Vermehrung kann aber davon ausgegangen werden, dass auch *A. niger* zur Hyphenfusion befähigt ist.

Unter diesen Gesichtspunkten lag die Vermutung nahe, dass in den Stämmen $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ die Hyphenfusion beeinträchtigt sein könnte. Entsprechend ergab sich daraus die Hypothese, dass die verminderte Wachstumsgeschwindigkeit der Mutanten nicht auf einer Beteiligung der Kinase an einer für das Hyphenwachstum wichtigen Signalweiterleitung, sondern durch eine geringere Vernetzung des Myzels verursacht wird. Eine Folge wäre der Wegfall des Austauschs von Nährstoffen und Vesikeln zwischen den Hyphen, sodass jede Hyphe der Mutanten sich eigenständig versorgen und organisieren muss. Die Bedeutung der Vernetzung für den Nährstofftransport wurde mit Hilfe von *N. crassa* Fusionsmutanten untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass vor allem in jungen, metabolisch aktiven Hyphen ein sehr umfangreicher Nährstoffaustausch zwischen den Kompartimenten stattfindet (Simonin *et al.* 2012).

Die geringe Reduzierung der Wachstumsgeschwindigkeit der Hyphen wäre somit nur ein Sekundäreffekt der Unfähigkeit der Ausschaltmutanten ein Hyphennetzwerk zu bilden.

Unterstützt wird diese Vermutung durch die Untersuchungen von Mutanten, für die ein Defekt bei der Hyphenfusion sicher beschrieben ist. So wurde bereits bei der ersten Fusionsmutante von *N. crassa* ein Wachstumsdefekt und ein unregelmäßig ausgeprägter Hyphenrand, bei dem einzelne Hyphen deutlich aus der Wachstumsfront hervorstachen, beschrieben (Wilson und Dempsey 1999). Auch für eine Vielzahl anderer Fusionsmutanten, wie der $\Delta ham-1$ - oder der $\Delta wsc-1$ -Mutanten aus *N. crassa* (Maddi *et al.* 2012), der $\Delta mgv1$ -Mutante aus *F. graminearum* (Hou *et al.* 2002) oder der $\Delta steC$ -Mutante aus *A. nidulans* (Wei *et al.* 2003) wurde neben den Fusions- auch einen deutlichen Wachstumsdefekt beschrieben.

Neben diesem indirekten Effekt besteht auch die Möglichkeit eines direkten Beitrags der MAP-Kinase MAKB an Wachstumsprozessen der Hyphenspitzen. So konnte in *N. crassa* gezeigt werden, dass die MAP-Kinase MAK-2 mit dem Spitzenkörper assoziiert vorliegt (Dettmann *et al.* 2012). Der an den Hyphenspitzen lokalisierte Spitzenkörper ist ein Komplex aus Vesikeln, Bestandteilen des Zellskeletts und Polaritätsfaktoren und nimmt beim polaren Spitzenwachstum der Hyphen eine zentrale Position ein (Virag und Harris 2006, Riquelme *et al.* 2011). Wenngleich eine Lokalisierung von MAKB an wachsenden Hyphenspitzen von *A. niger* nicht möglich war, konnte dennoch ein zytoplasmatisches MAKB-GFP Signal in den Randbereichen radial wachsender Kolonien beobachtet werden (Abb. 3.34). Somit besteht die Möglichkeit, dass MAKB an der Weiterleitung von Informationen des polaren Hyphenwachstums beteiligt ist und direkten Einfluss auf die Effektivität dieses Prozesses hat.

Konidiophormorphologie

Die Konidiophore der $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ Ausschaltmutanten weisen keine morphologischen Unterschiede im Vergleich zu Wildtyp-Konidiophoren auf. Die Bildung der Sporenköpfe setzt, je nach Nährstoffversorgung, verzögert im Vergleich zum Wildtyp ein, bildet in Anzahl und Erscheinungsbild aber eine vergleichbare Menge an primären und sekundären Sterigmata. Die bereits mehrfach für die entsprechenden Ausschaltmutanten in *A. nidulans* beschriebenen, erheblichen morphologischen Deformationen konnten dagegen zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden (Wei *et al.* 2003, Jun *et al.* 2011). Dagegen stimmt die Lokalisierung von MAKB-GFP in den Metulae und Phialiden von *A. niger* mit der Lokalisierung von MpkB-GFP und SteC-GFP (der MAKKK von MpkB) in *A. nidulans* überein. (Bayram *et al.* 2012, Wei *et al.* 2003). Bayram *et al.* beschreibt darüber hinaus, dass MpkB-GFP vor allem in den Kernen und den Septen der Metulae und Phialiden akkumuliert. Eine Bestätigung der Kernlokalisierung war mit der Expression von MAKB-GFP, unter Kontrolle des *makb*-Promotors und vom ursprünglichen *makb*-Locus abgelesen, nicht möglich. Dagegen zeigte das MAKB-GFP Fusionskonstrukt unter Kontrolle des konstitutiv aktiven *pki1*-Promotors eine deutliche Tendenz in den Kernen zu akkumulieren, wobei dies unabhängig vom Ort und Entwicklungszustand in allen Kompartimenten zu beobachten war. Ausgehend von diesen Daten ist nicht eindeutig feststellbar, ob die verstärkte Kernlokalisierung der stark überexprimierten Kinase MAKB ein Artefakt ist oder ob die Kernlokalisierung von

MAKB unter Kontrolle des *makb*-Promotors aufgrund einer zu geringen Signalstärke mit unseren Mittel nicht detektierbar war.

Sporulation

Die Unterbrechung des MAKB-Signalwegs ermöglichte einen neuen Ansatz zur Untersuchung der Induktion der Sporenbildung in *A. niger*. Unsere Daten zeigen zum einen, dass im Wildtyp MAKB die Sporulation in Abhängigkeit von der Myzeldichte induziert und zum anderen, dass in den Ausschaltmutanten die Sporenbildung ausschließlich von der Nährstoffversorgung abhängt, wobei der Signalweg der die Induktion vermittelt, unbekannt ist.

Auswirkungen von *makb*-orthologen Ausschaltungen auf die Sporulation

Eine Reduktion der Sporenmenge konnte u.a. für $\Delta mpkB$ -Mutanten aus *A. nidulans* (Jun *et al.* 2011, Bayram *et al.* 2012), $\Delta mak-2$ -Stämmen aus *N. crassa* (Pandey *et al.* 2004) und $\Delta cmk1$ aus *C. lagenarium* (Takano *et al.* 2000) gezeigt werden. Im Gegensatz dazu wurde für die entsprechenden Deletionsmutanten $\Delta cpMK2$ aus *Cryphonectria parasitica* (Choi *et al.* 2005) und $\Delta chk1$ aus *Cochliobolus heterostrophus* (Lev *et al.* 1999) ein vollständiger Ausfall der Konidienbildung beschrieben. Für $\Delta tmkA$ aus *T. vires* (Mukherjee *et al.* 2003, Kumar *et al.* 2010), $\Delta fmk1$ aus *Fusarium oxysporum* (Di Pietro *et al.* 2001) und $\Delta pmk1$ aus *M. grisea* (Xu und Hamer 1996) konnte dagegen keine Auswirkungen auf die gebildete Konidienmengen dokumentiert werden. Die Induktion der Sporenbildung durch MAKB und ihren orthologen MAP-Kinasen ist somit in vielen, wenn auch nicht allen, Pilzen konserviert und ein Verlust der MAP-Kinase wirkt sich direkt auf die Sporenbildung aus. Darüber hinaus besitzen die meisten filamentösen Pilze einen zweiten Mechanismus, der unabhängig von der MAKB orthologen MAP-Kinase die Sporenbildung induzieren kann. Die Induktion der Sporenbildung über diesen zweiten Mechanismus führt dabei zumeist zu einer geringeren Sporenmenge.

Sporulation - Abhängigkeit vom Myzelalter bzw. der Myzeldichte

Axelrod *et al.* (1973) kommt durch Synchronisationsexperimente zu der Schlussfolgerung, dass ein Myzel ein Mindestalter aufweisen muss, bevor es zur Sporulation befähigt ist. Da er für seinen Experimente keine Energie- oder Stickstofflimitierung beschreibt, kann davon ausgegangen werden, dass ausreichend Nährstoffe vorhanden waren und die Konidienbildung durch einen MAKB-orthologen Signalweg induziert wurde.

Brown *et al.* (2009) konnte in Untersuchungen mit *A. flavus* zeigen, dass die Indukti-

on der Konidien- bzw. Sklerotienbildung entgegengesetzt verläuft und direkt von der Myzeldichte abhängt. Als Botenstoff, der den Hyphen das Erreichen eines bestimmten Grenzwerts anzeigt, wurde Linolsäure bzw. Linolsäure-Derivate identifiziert. Linolsäure ist die am häufigsten vorkommende Fettsäure in Aspergillen. Es ist daher davon auszugehen, dass die Anreicherung eines Botenstoffs, möglicherweise eines Linolsäure-Derivats, das Signal für die Induktion der Sporenbildung in *A. niger* darstellt. Linolsäure selbst scheint dabei nicht das Myzeldichte-Signal in *A. niger* zu sein, da dessen Anwesenheit keine Auswirkungen auf die Differenzierung des Myzels hatte (Daten nicht gezeigt). Unter dem Gesichtspunkt, dass *A. niger* eine relativ konstante Wachstumsgeschwindigkeit der Hyphen aufweist, ist es sehr wahrscheinlich, dass das von Axelrod *et al.* beschriebene Mindestalter des Myzels mit dem Erreichen der von Brown *et al.* beschriebenen Myzeldichte gleichzusetzen ist.

Ob das Einleiten der Sporenbildung nach einer definierten Zeitspanne oder nach dem Erreichen einer Mindestmyzeldichte auch den frühest möglichen Zeitpunkt darstellt, ab dem das Myzel theoretisch in der Lage ist zu differenzieren und Konidiophore zu bilden, muss dabei nicht zwingend gegeben sein. Es ist auch möglich, dass das Myzel diese Kompetenz schon zu einem früheren Zeitpunkt erreicht, die Induktion der Sporenbildung zu diesem Zeitpunkt aber über die in den Veröffentlichungen überprüften Mechanismen noch nicht erfolgt.

Sporulation bei Nährstoffmangel

Unsere Ergebnisse zeigen, dass unter Nährstoffmangel die Sporulation im Wildtyp und den Mutanten früher einsetzt als auf Medium mit einer ausreichenden Nährstoffversorgung (Abb. 3.28). Demnach besitzt das Myzel zu diesem Zeitpunkt bereits die Kompetenz zu sporulieren (Skromne *et al.* 1995, Krijgheld *et al.* 2013). Die Induktion der Sporenbildung erfolgte zu diesem Zeitpunkt nicht durch den MAKB-Signalweg, da zum einen nach Brown *et al.* noch keine ausreichende Myzeldichte erreicht wurde und zum anderen kein Unterschied zwischen dem Wildtyp und den Mutanten mit dem unterbrochenen MAKB-Signalweg erkennbar war.

Diese Ergebnisse, zusammen mit den Beobachtungen der submersen Sporulation, legen die Vermutung nahe, dass die nährstoffabhängige Induktion der Sporenbildung eine Strategie von *A. niger* darstellt, mit der er seine Verbreitung auch unter ungünstigen Lebensbedingungen sicherstellt. Wird der nährstoffabhängige Signalweg aktiviert, ver-

setzt dies den Pilz in die Lage, einen Großteil der Kontrollmechanismen und Grundvoraussetzungen der vegetativen Sporenbildung zu umgehen. Dies wird vor allem bei der submersen Konidienbildung erkennbar (Abb. 3.30), da das Fehlen von Sauerstoff ansonsten eine Inhibierung der durch MAKB induzierten Sporenbildung bewirkt. Die Ergebnisse unterstreichen die Kompetenz des nährstoffabhängigen Signalwegs, die Konidienbildung auch unter ungünstigen Bedingungen zu induzieren und beweisen, dass dieser Signalweg unabhängig vom MAKB-Signalweg agiert.

Sporulation bei ausreichender Nährstoffversorgung

Betrachtet man die Sporulation in den Ausschaltmutanten bei ausreichender Nährstoffversorgung erkennt man, dass diese stark verzögert eingeleitet bzw. bei sehr hohen Glukosekonzentrationen, vollständig unterdrückt wird. Im Gegensatz dazu hat die Glukosekonzentration keinen Einfluss auf die Sporenbildung des Wildtyps. Die Induktion erfolgt bei allen Konzentrationen zu identischen Zeitpunkten und ist demnach ausschließlich von MAKB und somit von der Myzeldichte der Kolonie abhängig. Nach Axelrod *et al.* stimmt dieser Zeitpunkt mit dem Myzelmindestalter für die Sporenbildung überein. Unsere Ergebnisse zeigten dagegen, dass dies nicht der frühest mögliche Zeitpunkt für die Konidienbildung ist, sondern nur der frühest mögliche Zeitpunkt, der durch den MAKB-Signalweg induziert werden kann.

Auswirkungen der Glukosekonzentration auf die Sporenmenge

Nach dem Einsetzen der Sporenbildung im Wildtyp ist die absolute Menge der gebildeten Konidien direkt von der Ausgangskonzentration an Glukose abhängig. Das heißt, dass der Wildtyp einen Großteil der ihm zur Verfügung stehenden Energie zur Konidienbildung verwendet. Im Gegensatz dazu ist in $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ oberhalb einer bestimmten Glukosekonzentration keinerlei Sporenbildung erkennbar, ein Großteil der zur Verfügung stehenden Energie wird dementsprechend ausschließlich zum Aufrechterhalten des allgemeinen Zellmetabolismus verwendet. Erst beim Unterschreiten der beschriebenen Glukose-Grenzkonzentration setzt die Sporenbildung ein. Da diese Grenzkonzentration immer gleich und unabhängig von der Ausgangskonzentration ist, steht ab dem Einsetzen der Sporenbildung in den Mutanten immer die gleiche Glukosemenge als Energiequelle für die Konidienbildung zur Verfügung. In Folge dessen stagniert die absolute Sporenmenge in den Ausschaltmutanten ab einer bestimmten Ausgangskonzentration an Glukose und steigt nicht parallel, wie es für den Wildtyp

beobachtet wurde, mit dieser an (Abb. 3.27). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die konstante Konidienmenge der Mutanten direkt mit der Glukose-Grenzkonzentration, unterhalb derer die Induktion der Sporenbildung erfolgt, korreliert und nicht durch die Deletion der MAP-Kinasen MAKB verursacht wird.

Bei geringen Glukosekonzentrationen (12,5 bzw. 25 mM) verhalten sich der Wildtyp und die Ausschaltmutanten dagegen identisch, es sind keine Unterschiede in der Sporenzahl erkennbar.

Sporulation - Glukose-Maximalkonzentration für die Aktivierung der MAKB-unabhängigen Sporeninduktion

Die Nährstoffkonzentration oberhalb welcher keine Konidiophorentwicklung in $\Delta makbAB$ bzw. $\Delta ste7AB$ erfolgt, muss für eine vollständige Inhibierung mindestens 110 bis 150 mM Glukose im Medium betragen (Abb. 3.31). Womöglich ist die beschriebene, vollständige Unterdrückung der Sporenbildung in *C. parasitica* ebenfalls auf eine Inhibierung aufgrund einer ausreichenden Nährstoffversorgung zurückzuführen, da die Versuche auf nährstoffhaltigem PDA-Medium durchgeführt wurden und keine Angaben zur Nährstoffkonzentration im Medium zum Probenzeitpunkt erfolgten (Choi *et al.* 2005).

Die Konzentration von 110 bis 150 mM Glukose, unterhalb derer die Sporenbildung in den Mutanten induziert wird, steht dabei mit einigen Ergebnissen, u.a. der radialen Kolonieentwicklung auf Festmedium, im Widerspruch. Bei der Analyse der Entwicklung der Kolonie kam es bereits ab einer Konzentration von 50 mM Glukose zu einer zeitlichen Verschiebung und somit zu einer Inhibierung der Sporulation bei $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ im Vergleich zum Wildtyp. Die Ursache für diese Diskrepanz ist wahrscheinlich bei der Analyse der Glukosekonzentration zu suchen. Im Laufe des Versuchs entwickelte sich eine einige Millimeter dicke Myzelschicht über dem Flüssigmedium. Die Glukose musste daher durch das gesamte Myzel bis in die oberen Bereiche transportiert werden, wobei sie verbraucht wurde und mit zunehmender Myzelstärke die Konzentration an Glukose, die die oberen Myzelbereiche erreichte, sank. Die gemessene Glukosekonzentration beim Einsetzen der Sporulation stellt daher eher die Grenzkonzentration dar, ab der nicht mehr genügend Glukose durch das Myzel diffundiert oder transportiert wird, sodass in den von der Quelle am weitesten entfernten Myzelbereichen die Sporenbildung durch Nährstoffmangel induziert werden konnte.

Auswirkungen der dauerhaften Aktivierung von MAKB auf die Konidiophorentwicklung

Neben den Ausschaltmutanten wurden für die Charakterisierung des *makb*-Signalwegs auch die dominant aktiven *ste7daAB*-Mutanten verwendet. Orthologe Mutanten wurden bereits in anderen Organismen wie *N. crassa* (Dettmann *et al.* 2012), *Ustilago maydis* (Müller *et al.* 2003) oder *S. cerevisiae* (Maleri *et al.* 2004) beschrieben, wobei es teilweise zu sehr unterschiedlichen Auswirkungen kam. Für *U. maydis* wurde ein irreguläres Filamentwachstum beschrieben, wobei die Strukturen Ähnlichkeiten zu Konjugations-Schläuchen aufwiesen. Konjugations-Schläuchen benötigt *U. maydis* um, in Anwesenheit eines passenden Partners, von seiner haploiden in die diploide, pathogene Form zu wechseln. Auch für *S. cerevisiae* wurde eine Förderung des filamentösen Wachstums durch die dominant aktive Ste7-Kinase beschrieben, dagegen weisen entsprechende *N. crassa*-Mutanten erhebliche Entwicklungsdefizite auf und sind nahezu nicht lebensfähig.

In *A. niger ste7daAB* ist, wie in den Ausschaltmutanten, eine deutliche Reduzierung der gebildeten Sporenmenge im Vergleich zum Wildtyp erkennbar. Im Gegensatz zu $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ setzte die Sporenbildung aber nicht zeitverzögert zum Wildtyp ein. Des Weiteren war die Sporenmenge der *ste7daAB*-Mutanten konstant um die gleiche Menge, im Vergleich zum Wildtyp, reduziert (Abb. 3.38), wohingegen sich die Differenz der Sporenmenge zwischen den Ausschaltmutanten und dem Wildtyp mit der Zeit verringerte (Abb. 3.20). Da keine Zeitverzögerung bei der Sporulation erkennbar war, ist es wahrscheinlich, dass die Sporenbildung in den *ste7daAB*-Mutanten durch den MAKB-Signalweg induziert wurde. Auch die reduzierte Konidienmenge in den dominant aktiven Mutanten kann durch die dauerhafte Aktivierung des MAKB-Signalwegs verursacht werden. Zwar zeigte die Mikroskopie radial wachsender Kolonien, dass dauerhaft aktiviertes MAKB die Konidiophorbildung früher einleitet, es ist aber durchaus möglich, dass im weiteren Entwicklungsverlauf das aktivierte MAKB inhibierend auf die Konidienbildung wirkt.

Modell der Sporeninduktion in *A. niger*

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse der Untersuchung von MAKB, dass die Kinase an der Myzeldichte-abhängigen Regulation der Sporenbildung in *A. niger* beteiligt ist. Die MAP-Kinase steuert dabei u.a. den Bildungszeitpunkt der Stiele und

somit aller folgenden Strukturen der Konidiophore, wobei sie vor allem bei der Induktion der primären und sekundären Sterigmata im Vesikel akkumuliert. In $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ wird die Sporenbildung dagegen nährstoffabhängig induziert. Das optische Erscheinungsbild der Konidiophore entspricht dem Wildtyp, sodass davon ausgegangen werden kann, dass der zweite Signalweg die gleichen Mechanismen zur Konidiophor- und Konidienbildung aktiviert, wie der MAKB-Signalweg.

Es wird angenommen, dass ein Pilzmyzel die Kompetenz, Konidien zu bilden, im Anschluss an die Keimung erst erlangen muss (Axelrod *et al.* 1973). Unsere Ergebnisse zeigen allerdings, dass die MAKB-abhängige Induktion der Konidienbildung vor allem von der Myzeldichte, sowie einer Mindestzeitspanne mit Zugang zu Umgebungsluft, abhängt. Der MAKB-unabhängige Signalweg ist dagegen in der Lage, bei Nährstoffmangel, die Sporenbildung früher als der MAKB-abhängige Signalweg zu induzieren (Abb. 4.1) und auch die *ste7daAB*-Mutanten sind in der Lage, die Entwicklung von Konidiophore in nur wenige Stunden altem Myzel einzuleiten. Demnach besteht zwar weiterhin die Möglichkeit, dass ein Myzel die Kompetenz zur Sporenbildung erst im Laufe seiner Entwicklung erwerben muss, allerdings ist das entsprechende Mindestalter diesbezüglich schwer definierbar.

Einfluss von MAKB auf die Produktion von Sekundärmetaboliten

Filamentöse Pilze sind in der Lage, eine große Bandbreite von Sekundärmetaboliten herzustellen. Die exakten chemischen Verbindungen sind dabei meist artspezifisch und die tatsächliche Synthese hängt oft von äußeren Einflüssen sowie vom Entwicklungsstadium des Pilzes ab. Expressionsuntersuchungen haben gezeigt, dass die Regulierung der Synthese von Sekundärmetaboliten auch von MAP-Kinasen abhängt (Bayram *et al.* 2012). Es konnte gezeigt werden, dass MpkB in *A. nidulans* essentiell für die Aktivierung der Synthese des Antibiotikums Penicillin, des Karzinogens Sterigmatocystin und des möglichen Tumormedikaments Terrequinone A ist (Atoui *et al.* 2008). Bayram *et al.* (2012) konnte außerdem zeigen, dass die MAP-Kinase nicht direkt einen Transkriptionsfaktor anspricht, sondern dass sie durch Phosphorylierung von VeA die Bildung des VeA, VelB und LaeA-Komplexes fördert, dem zentralen Regulator der Sekundärmetabolit-Expression in *A. nidulans*. Ein auffälliges Merkmal von $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ war die Anreicherung von vermutlich Melanin im Medium unterhalb sporenbildender Bereiche. Park *et al.* (2008) konnte mit einer *N. crassa* $\Delta mak-1-$

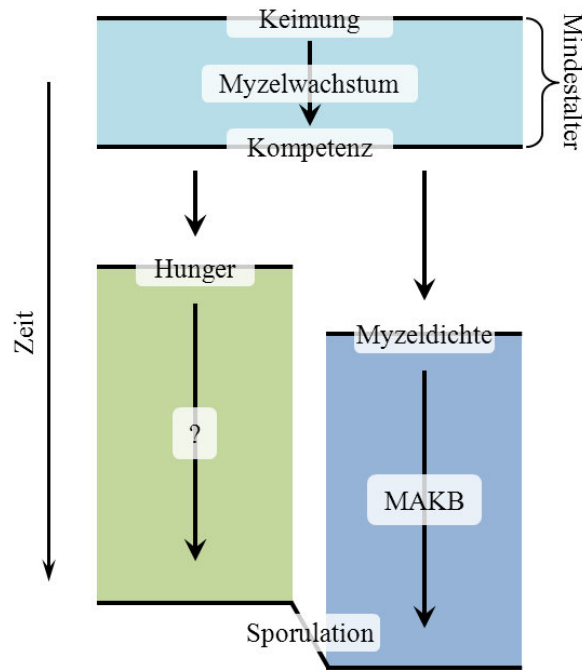


Abb. 4.1: Modell der Induktion der Konidiogenese in *A. niger*. Die Induktion der Sporenbildung kann nach Erreichen der Kompetenz des Myzels zur Differenzierung durch zwei unabhängige Signalwege erfolgen. Die Hunger-induzierte Sporenbildung kann früher als die Myzeldichte-induzierte Sporenbildung erfolgen. Dies hängt allerdings direkt von der Nährstoffversorgung ab.

Mutante zeigen, dass die Melanin-Biosynthese durch cAMP aktiviert und durch die Kinase MAK-1 reprimiert wird. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass MAKB in *A. niger* ebenfalls einen reprimierenden Einfluss auf die Melanin-Biosynthese besitzt.

In weiteren Analysen betrachteten wir den Einfluss der Kinase auf die Synthese und Freisetzung von volatilen Stoffen. Diese Stoffe sind noch relativ wenig untersucht, wobei bereits 250 Verbindungen identifiziert werden konnten, von denen viele einen charakteristischen Geruch aufweisen (Morath *et al.* 2012). Die Aufgaben der Verbindungen sind nur zum Teil bekannt, ein Großteil dürfte aber der Kommunikation dienen. Ein Merkmal von $\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$ war ein intensiver Erdgeruch, der regelmäßig bei den Mutanten, aber niemals beim Wildtyp mit der entsprechenden Intensität wahrgenommen wurde. Der Geruch wird wahrscheinlich durch Geosmin verursacht. Die Analysen bestätigten diese Beobachtung teilweise, da nur ein ebenfalls flüchtiger Vorläufer von Geosmin in einer deutlich erhöhten Konzentration identifiziert werden konnte. Somit konnte gezeigt werden, dass auch die Regulierung der Synthese von volatilen Stoffen u.a. über MAP-Kinase-Signalwegen erfolgt.

Literatur

- Albertyn, J., S. Hohmann, J. M. Thevelein und B. A. Prior (1994). „**GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway.**“ eng. *Mol Cell Biol* 14.6, S. 4135–4144.
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers und D.J. Lipman (1990). „**Basic local alignment search tool.**“ *J. Mol. Biol.* 215, S. 403–410.
- Amanullah, A., E. Leonildi, A.W. Nienow und C.R. Thomas (2001). „**Dynamics of mycelia aggregation in cultures of *Aspergillus oryzae*.**“ *Bioproc Biosys* 24, S. 101–107.
- Atoui, Ali, Dapeng Bao, Naveet Kaur, W Scott Grayburn und Ana M. Calvo (2008). „***Aspergillus nidulans* Natural Product Biosynthesis is Regulated by MpkB, a Putative Pheromone Response Mitogen-Activated Protein Kinase.**“ *Appl Environ Microbiol* 74.11, S. 3596–3600.
- Axelrod, D. E. (1972). „**Kinetics of differentiation of conidiophores and conidia by colonies of *Aspergillus nidulans*.**“ eng. *J Gen Microbiol* 73.1, S. 181–184.
- Axelrod, D. E., M. Gealt und M. Pastushok (1973). „**Gene control of developmental competence in *Aspergillus nidulans*.**“ *Dev Biol* 34.1, S. 9–15.
- Baker, Scott E. (2006). „***Aspergillus niger* genomics: past, present and into the future.**“ *Med Mycol* 44 Suppl 1, S17–S21.
- Bardwell, Lee (2005). „**A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway.**“ *Peptides* 26.2, S. 339–350.
- Bayram, Ozgür, Fatih Sari, Gerhard H. Braus und Stefan Irniger (2009). „**The protein kinase ImeB is required for light-mediated inhibition of sexual development and for mycotoxin production in *Aspergillus nidulans*.**“ *Mol Microbiol* 71.5, S. 1278–1295.
- Bayram, Özgür, Bayram 1 Özlem Sarikaya, Yasar Luqman Ahmed, Jun-Ichi Maruyama, Oliver Valerius, Silvio O. Rizzoli, Ralf Ficner, Stefan Irniger und Gerhard H. Braus (2012). „**The *Aspergillus nidulans* MAPK Module AnSte11-Ste50-**

- Ste7-Fus3 Controls Development and Secondary Metabolism**“. *PLOS Genetics* 8.
- Bell, Alois A. und Michael H. Wheeler (Sep. 1986). „**Biosynthesis and Functions of Fungal Melanins**“. *Annual Review of Phytopathology* 24.9, S. 411–451.
- Bowen, Lovitt und Wright (2000). „**Direct Quantification of Aspergillus niger Spore Adhesion in Liquid Using an Atomic Force Microscope**.“ *J Colloid Interface Sci* 228.2, S. 428–433.
- Brewster, J. L., T. de Valoir, N. D. Dwyer, E. Winter und M. C. Gustin (1993). „**An osmosensing signal transduction pathway in yeast**.“ eng. *Science* 259.5102, S. 1760–1763.
- Brown, Sigal Horowitz, James B. Scott, Jeyanthi Bhaheetharan, William C. Sharpee, Lane Milde, Richard A. Wilson und Nancy P. Keller (2009). „**Oxygenase coordination is required for morphological transition and the host-fungus interaction of Aspergillus flavus**.“ eng. *Mol Plant Microbe Interact* 22.7, S. 882–894.
- Bruno, K.S., S.A. Karagiosis, D.E. Culley, Z. Dai, J.K. Magnuson und S.E. Baker (2009). „**A MAP kinase required for successive tip formation during Citric Acid Production in Aspergillus niger**“. *Fungal Genetics Asilomar*. Bd. 25. 604, S. 268.
- Bussink, H. J. und S. A. Osmani (1999). „**A mitogen-activated protein kinase (MPKA) is involved in polarized growth in the filamentous fungus, Aspergillus nidulans**.“ *FEMS Microbiol Lett* 173.1, S. 117–125.
- Calvo, Ana M., Richard A. Wilson, Jin Woo Bok und Nancy P. Keller (2002). „**Relationship between secondary metabolism and fungal development**.“ eng. *Microbiol Mol Biol Rev* 66.3, S. 447–459.
- Carrillo, Leonor (2003). *Los hongos de los alimentos y forrajes*. Universidad Nacional de Salta.
- Casselton, Lorna und Miriam Zolan (2002). „**The art and design of genetic screens: filamentous fungi**“. *Nature Reviews Genetics* 3, S. 683–697.
- Champe, S.P., M.B. Kunz, L.N. Yager, N.J. Butnick und D.E. Axelrod (1981). „**Spore formation in Aspergillus nidulans: competence and other developmental processes**.“ *The Fungal Spore: Morphogenetic Controls*, S. 255–276.

- Chang, Y. C. und W. E. Timberlake (1993). „**Identification of *Aspergillus* brlA response elements (BREs) by genetic selection in yeast.**“ eng. *Genetics* 133.1, S. 29–38.
- Chen, R. E. und J. Thorner (2010). „**Systematic epistasis analysis of the contributions of protein kinase A- and mitogen-activated protein kinase-dependent signaling to nutrient limitation-evoked responses in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.**“ eng. *Genetics* 185.3, S. 855–870.
- Chen, Raymond E. und Jeremy Thorner (2007). „**Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.**“ *Biochim Biophys Acta* 1773.8, S. 1311–1340.
- Choi, Eun-Sil, Hea-Jong Chung, Myoung-Ju Kim, Seung-Moon Park, Byeong-Jin Cha, Moon-Sik Yang und Dae-Hyuk Kim (2005). „**Characterization of the ERK homologue CpMK2 from the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*.**“ eng. *Microbiology* 151.Pt 5, S. 1349–1358.
- Clutterbuck, A. J. (1969). „**A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*.**“ eng. *Genetics* 63.2, S. 317–327.
- (1996). „**Parasexual recombination in fungi**“ . *J. Genet.* 75, S. 281–286.
- Cochrane, Vincent W. (1958). *Physiology of Fungi*. John Wiley und Sons.
- Cole, G.T., Sekiya T., Kasai R., Yokoyama T. und Nozawa Y. (1979). „**Surface Ultrastructure and Chemical Composition of the Cell Walls of Conidial Fungi.**“ *Experimental Mycology* 3, S. 132–156.
- Colopy, Patrick D., Hildur V. Colot, Gyungsoon Park, Carol Ringelberg, Christopher M. Crew, Katherine A. Borkovich und Jay C. Dunlap (2010). „**High-throughput construction of gene deletion cassettes for generation of *Neurospora crassa* knockout strains.**“ eng. *Methods Mol Biol* 638, S. 33–40.
- Colot, Hildur V., Gyungsoon Park, Gloria E. Turner, Carol Ringelberg, Christopher M. Crew, Liubov Litvinkova, Richard L. Weiss, Katherine A. Borkovich und Jay C. Dunlap (2006). „**A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors.**“ eng. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103.27, S. 10352–10357.

- Conesa, A., P. J. Punt, N. van Luijk und C. A. van den Hondel (2001). „**The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view.**“ eng. *Fungal Genet Biol* 33.3, S. 155–171.
- Cooper, J. A., B. M. Sefton und T. Hunter (1984). „**Diverse mitogenic agents induce the phosphorylation of two related 42,000-dalton proteins on tyrosine in quiescent chick cells.**“ eng. *Mol Cell Biol* 4.1, S. 30–37.
- Csank, C., K. Schröppel, E. Leberer, D. Harcus, O. Mohamed, S. Meloche, D. Y. Thomas und M. Whiteway (1998). „**Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog, Cek1p, in hyphal development and systemic candidiasis.**“ eng. *Infect Immun* 66.6, S. 2713–2721.
- Currie, J.N. (1917). „**The citric acid fermentation of *Aspergillus niger***“. *J Bio Chem* 31, S. 15–37.
- Deacon, J. (2005). ***Fungal Biology.*** Blackwell Publishers.
- Dettmann, Anne, Julia Illgen, Sabine März, Timo Schürg, Andre Fleissner und Stephan Seiler (2012). „**The NDR kinase scaffold HYM1/MO25 is essential for MAK2 map kinase signaling in *Neurospora crassa*.**“ eng. *PLoS Genet* 8.9, e1002950.
- Devchand, M. und D. I. Gwynne (1991). „**Expression of heterologous proteins in *Aspergillus***“. *Journal of Biotechnology* 17, S. 3–10.
- Di Pietro, A., F. I. Garcia-MacEira, E. Mègelecz und M. I. Roncero (2001). „**A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis.**“ eng. *Mol Microbiol* 39.5, S. 1140–1152.
- Dietrich, S. (2009). ***Die Bedeutung von Melanin auf die Morphogenese und Produktivität von *Aspergillus niger*.***
- Driouch, Habib, Andreas Roth, Petra Dersch und Christoph Wittmann (2010). „**Optimized bioprocess for production of fructofuranosidase by recombinant *Aspergillus niger*.**“ eng. *Appl Microbiol Biotechnol* 87.6, S. 2011–2024.
- Dynesen, Jens und Jens Nielsen (2003). „**Surface hydrophobicity of *Aspergillus nidulans* conidiospores and its role in pellet formation.**“ eng. *Biotechnol Prog* 19, S. 1049–1052.
- Elander, R. P. (2003). „**Industrial production of beta-lactam antibiotics**“. eng. *Appl Microbiol Biotechnol* 61.5-6, S. 385–392.

- Elion, E. A., J. A. Brill und G. R. Fink (1991). „**FUS3 represses CLN1 and CLN2 and in concert with KSS1 promotes signal transduction.**“ eng. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88.21, S. 9392–9396.
- Enshasy, H. el, K. Hellmuth und U. Rinas (1999). „**Fungal morphology in submerged cultures and its relation to glucose oxidase excretion by recombinant Aspergillus niger.**“ eng. *Appl Biochem Biotechnol* 81.1, S. 1–11.
- EU-RoFA (2012). ***European Union Register of Feed Additives pursuant to Regulation (EC) No 1831/2003.***
- Finkelstein, D. B. (1987). „**Improvement of enzyme production in Aspergillus.**“ eng. *Antonie Van Leeuwenhoek* 53.5, S. 349–352.
- Fischer, R. und W. E. Timberlake (1995). „**Aspergillus nidulans apsA (anucleate primary sterigmata) encodes a coiled-coil protein required for nuclear positioning and completion of asexual development.**“ eng. *J Cell Biol* 128.4, S. 485–498.
- Fleissner, Andre, Abigail C. Leeder, M Gabriela Roca, Nick D. Read und N Louise Glass (2009). „**Oscillatory recruitment of signaling proteins to cell tips promotes coordinated behavior during cell fusion.**“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 106.46, S. 19387–19392.
- Fontaine, Thierry, Anne Beauvais, CÃ©line Loussert, BenoÃ®t Thevenard, Claus C. Fulgsang, Naohito Ohno, CÃ©cile Clavaud, Marie-Christine Prevost und Jean-Paul LatgÃ© (2010). „**Cell wall alpha1-3glucans induce the aggregation of germinating conidia of Aspergillus fumigatus.**“ *Fungal Genet Biol* 47.8, S. 707–712.
- Galbraith, J. C. und J. E. Smith (1969). „**Sporulation of Aspergillus niger in submerged liquid culture.**“ eng. *J Gen Microbiol* 59.1, S. 31–45.
- Gamarra, Norma N., Gretty K. Villena und Marcel GutiÃ©rrez-Correa (2010). „**Cellulase production by Aspergillus niger in biofilm, solid-state, and submerged fermentations.**“ *Appl Microbiol Biotechnol* 87.2, S. 545–551.
- Gerin, P. A., Y. Dufrene, M. N. Bellon-Fontaine, M. Asther und P. G. Rouxhet (1993). „**Surface properties of the conidiospores of Phanerochaete chrysosporium and their relevance to pellet formation.**“ eng. *J Bacteriol* 175.16, S. 5135–5144.

- Gibbs, P. A., R. J. Seviour und F. Schmid (2000). „*Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions.*“ eng. *Crit Rev Biotechnol* 20.1, S. 17–48.
- Gimeno, C. J., P. O. Ljungdahl, C. A. Styles und G. R. Fink (1992). „**Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS.**“ eng. *Cell* 68.6, S. 1077–1090.
- Girardin, H., S. Paris, J. Rault, M. N. Bellon-Fontaine und J. P. Latge (1999). „**The role of the rodlet structure on the physicochemical properties of *Aspergillus conidia*.**“ eng. *Lett Appl Microbiol* 29.6, S. 364–369.
- Gómez, Beatriz L. und Joshua D. Nosanchuk (2003). „**Melanin and fungi.**“ eng. *Curr Opin Infect Dis* 16.2, S. 91–96.
- Goodwin, S.B., R.K. Webster und R.W. Allard (1994). „**Evidence for mutation and migration as sources of genetic variation in populations of *Rhynchosporium secalis*.**“ *Phytopathology* 84, S. 1047–1053.
- Gordon, C. L., V. Khalaj, A. F. Ram, D. B. Archer, J. L. Brookman, A. P. Trinci, D. J. Jeenes, J. H. Doonan, B. Wells, P. J. Punt, C. A. van den Hondel und G. D. Robson (2000). „**Glucoamylase::green fluorescent protein fusions to monitor protein secretion in *Aspergillus niger*.**“ eng. *Microbiology* 146 (Pt 2), S. 415–426.
- Grimm, L. H., S. Kelly, J. Hengstler, A. Göbel, R. Krull und D. C. Hempel (2004). „**Kinetic studies on the aggregation of *Aspergillus niger conidia*.**“ *Biotechnol Bioeng* 87.2, S. 213–218.
- Grimm, L. H., S. Kelly, I. I. Völkerding, R. Krull und D. C. Hempel (2005a). „**Influence of mechanical stress and surface interaction on the aggregation of *Aspergillus niger conidia*.**“ *Biotechnol Bioeng* 92.7, S. 879–888.
- Grimm, L. H., S. Kelly, R. Krull und D. C. Hempel (2005b). „**Morphology and productivity of filamentous fungi.**“ *Appl Microbiol Biotechnol* 69.4, S. 375–384.
- Grimm, L.H. (2006). *Dissertation: Sporenaggregationsmodell für die submerse Kultivierung koagulativer Myzelbildner.* Institut für Bioverfahrenstechnik. TU Braunschweig.

- Gutierrez-Correa, Marcel und Gretty K. Villena (2003). „**Surface adhesion fermentation: a new fermentation category**“. *Rev. peru. biol* 10(2), S. 113–124.
- Heller, Jens, Nadja Ruhnke, José Juan Espino, Michelli Massaroli, Isidro Gonzalez Collado und Paul Tudzynski (2012). „**The mitogen-activated protein kinase BcSak1 of *Botrytis cinerea* is required for pathogenic development and has broad regulatory functions beyond stress response.**“ eng. *Mol Plant Microbe Interact* 25.6, S. 802–816.
- Hill, H. Z. (1992). „**The function of melanin or six blind people examine an elephant.**“ eng. *Bioessays* 14.1, S. 49–56.
- Hille, A., T. R. Neu, D. C. Hempel und H. Horn (2005). „**Oxygen profiles and biomass distribution in biopellets of *Aspergillus niger*.**“ eng. *Biotechnol Bioeng* 92.5, S. 614–623.
- Hou, Z., C. Xue, Y. Peng, T. Katan, H.C. Kistler und J.-R. Xu (2002). „**A Mitogen-Activated Protein Kinase Gene (MGV1) in *Fusarium graminearum* Is Required for Female Fertility, Heterokaryon Formation, and Plant Infection**“. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, S. 1119–1127.
- Huang, M. Y. und H. R. Bungay (1973). „**Microprobe measurements of oxygen concentrations in mycelial pellets**“. *Biotechnology and Bioengineering* 15.6, S. 1193–1197.
- Hughes, H. B., R. Carzaniga, S. L. Rawlings, J. R. Green und R. J. O’Connell (1999). „**Spore surface glycoproteins of *Colletotrichum lindemuthianum* are recognized by a monoclonal antibody which inhibits adhesion to polystyrene.**“ *Microbiology* 145 (Pt 8), S. 1927–1936.
- Jacobson, E. S. (2000). „**Pathogenic roles for fungal melanins.**“ eng. *Clin Microbiol Rev* 13.4, S. 708–717.
- Jahn, B., F. Boukhallouk, J. Lotz, K. Langfelder, G. Wanner und A. A. Brakhage (2000). „**Interaction of human phagocytes with pigmentless *Aspergillus conidia*.**“ *Infect Immun* 68.6, S. 3736–3739.
- Joosten, Vivi, Christien Lokman, Cees van den Hondel und Peter Punt (2003). „**The production of antibody fragments and antibody fusion proteins by yeasts and filamentous fungi.**“ *Microbial Cell Factories* 2.1, S. 1.

- Jørgensen, Thomas R., Joohae Park, Mark Arentshorst, Anne Marie van Welzen, Gerda Lamers, Patricia A. Vankuyk, Robbert A. Damveld, Cees A M. van den Hondel, Kristian F. Nielsen, Jens C. Frisvad und Arthur F J. Ram (2011). „**The molecular and genetic basis of conidial pigmentation in *Aspergillus niger*.**“ *Fungal Genet Biol* 48.5, S. 544–553.
- Jun, Sang-Cheol, Sei-Jin Lee, Hyun-Joo Park, Ji-Young Kang, Young-Eun Leem, Tae-Ho Yang, Mi-Hee Chang, Jung-Mi Kim, Seung-Hwan Jang, Hwan-Gyu Kim, Dong-Min Han, Keon-Sang Chae und Kwang-Yeop Jahng (2011). „**The MpkB MAP kinase plays a role in post-karyogamy processes as well as in hyphal anastomosis during sexual development in *Aspergillus nidulans*.**“ *J Microbiol* 49.3, S. 418–430.
- Kellis, Manolis, Bruce W. Birren und Eric S. Lander (2004). „**Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.**“ eng. *Nature* 428.6983, S. 617–624.
- Kelly, S, L. H. Grimm, R. Jonas, D. C. Hempel und R. Krull (2006). „**Investigation of the Morphogenesis of Filamentous Microorganisms**“. *Eng. Life Sci.* 5, S. 475–480.
- Kelly, Sven, Luis H. Grimm, Jan Hengstler, Ellen Schultheis, Rainer Krull und Dietmar C. Hempel (2004). „**Agitation effects on submerged growth and product formation of *Aspergillus niger*.**“ *Bioprocess Biosyst Eng* 26.5, S. 315–323.
- Kim, Soonok, Il-Pyung Ahn, Hee-Sool Rho und Yong-Hwan Lee (2005). „**MHP1, a Magnaporthe grisea hydrophobin gene, is required for fungal development and plant colonization.**“ eng. *Mol Microbiol* 57.5, S. 1224–1237.
- Krijgheld, P., R. Bleichrodt, G. J. van Veluw, F. Wang, W. H. Müller, J. Dijksterhuis und H A B. Wösten (2013). „**Development in *Aspergillus*.**“ eng. *Stud Mycol* 74.1, S. 1–29.
- Krisak, L., R. Strich, R. S. Winters, J. P. Hall, M. J. Mallory, D. Kreitzer, R. S. Tuan und E. Winter (1994). „**SMK1, a developmentally regulated MAP kinase, is required for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*.**“ eng. *Genes Dev* 8.18, S. 2151–2161.
- Kubo, Y., Y. Takano, N. Endo, N. Yasuda, S. Tajima und I. Furusawa (1996). „**Cloning and structural analysis of the melanin biosynthesis gene SCD1 encoding**

- scytalone dehydratase in *Colletotrichum lagenarium*.**“ eng. *Appl Environ Microbiol* 62.12, S. 4340–4344.
- Kumar, Ashish, Keren Scher, Mala Mukherjee, Ella Pardovitz-Kedmi, George V. Sible, Uma S. Singh, Sharad P. Kale, Prasun K. Mukherjee und Benjamin A. Horwitz (2010). „**Overlapping and distinct functions of two *Trichoderma virens* MAP kinases in cell-wall integrity, antagonistic properties and repression of conidiation.**“ eng. *Biochem Biophys Res Commun* 398.4, S. 765–770.
- Laemmli, U. K. (1970). „**Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.**“ eng. *Nature* 227.5259, S. 680–685.
- Langfelder, K., B. Jahn, H. Gehringer, A. Schmidt, G. Wanner und A. A. Brakhage (1998). „**Identification of a polyketide synthase gene (pksP) of *Aspergillus fumigatus* involved in conidial pigment biosynthesis and virulence.**“ eng. *Med Microbiol Immunol* 187.2, S. 79–89.
- Law, D. J. und W. E. Timberlake (1980). „**Developmental regulation of laccase levels in *Aspergillus nidulans*.**“ eng. *J Bacteriol* 144.2, S. 509–517.
- Lee, K. S., K. Irie, Y. Gotoh, Y. Watanabe, H. Araki, E. Nishida, K. Matsumoto und D. E. Levin (1993). „**A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C.**“ eng. *Mol Cell Biol* 13.5, S. 3067–3075.
- Leeuwenhoek, Antoni van (1673). „**A Specimen of Some Observations Made by a Microscope**“ . *Phil Trans R Soc* 8, S. 6037–6038.
- Lev, S., A. Sharon, R. Hadar, H. Ma und B. A. Horwitz (1999). „**A mitogen-activated protein kinase of the corn leaf pathogen *Cochliobolus heterostrophus* is involved in conidiation, appressorium formation, and pathogenicity: diverse roles for mitogen-activated protein kinase homologs in foliar pathogens.**“ eng. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96.23, S. 13542–13547.
- Lin, Ching-Hsuan, Siwy Ling Yang, Nan-Yi Wang und Kuang-Ren Chung (2010). „**The FUS3 MAPK signaling pathway of the citrus pathogen *Alternaria alternata* functions independently or cooperatively with the fungal redox-responsive AP1 regulator for diverse developmental, physiological and pathogenic processes.**“ *Fungal Genet Biol* 47.4, S. 381–391.

- Ma, H., S. Kunes, P. J. Schatz und D. Botstein (1987). „**Plasmid construction by homologous recombination in yeast.**“ eng. *Gene* 58.2-3, S. 201–216.
- Maddi, A., A. Dettman, C. Fu, S. Seiler und S.J. Free (2012). „**WSC-1 and HAM-7 Are MAK-1 MAP Kinase Pathway Sensors Required for Cell Wall Integrity and Hyphal Fusion in *Neurospora crassa***“. *PLOS one* 7.
- Madrid, M., T. Soto, H.K. Khong, A. Franco, Vicente J., P. Perez, M. Gacto und J. Cansado (2006). „**Stree-induced response, localization, and regulation of the Pmk1 cell integrity pathway in *Schizosaccharomyces pombe***.“ *J Biol Chem* 281, S. 2033–2043.
- Maeda, Hiroshi, Youhei Yamagata, Keietsu Abe, Fumihiko Hasegawa, Masayuki Machida, Ryoji Ishioka, Katsuya Gomi und Tasuku Nakajima (2005). „**Purification and characterization of a biodegradable plastic-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae***.“ eng. *Appl Microbiol Biotechnol* 67.6, S. 778–788.
- Maeda, M. und R. A. Firtel (1997). „**Activation of the mitogen-activated protein kinase ERK2 by the chemoattractant folic acid in *Dictyostelium***.“ eng. *J Biol Chem* 272.38, S. 23690–23695.
- Maerker, Claudia, Manfred Rohde, Axel A. Brakhage und Matthias Brock (2005). „**Methylcitrate synthase from *Aspergillus fumigatus*. Propionyl-CoA affects polyketide synthesis, growth and morphology of conidia.**“ *FEBS J* 272.14, S. 3615–3630.
- Magnuson, J. K. und L. L. Lasure (2004). „**Organic Acid Production by Filamentous Fungi**“. *Tkacz JS, Lange L (eds) Advances in fungal bio/technology for industry, agriculture and medicine. Springer, Berlin Heidelberg New York*, 307–340.
- Maleri, Seth, Qingyuan Ge, Elizabeth A. Hackett, Yuqi Wang, Henrik G. Dohlman und Beverly Errede (2004). „**Persistent activation by constitutive Ste7 promotes Kss1-mediated invasive growth but fails to support Fus3-dependent mating in yeast.**“ eng. *Mol Cell Biol* 24.20, S. 9221–9238.
- Maras, M., I. van Die, R. Contreras und C. A. van den Hondel (1999). „**Filamentous fungi as production organisms for glycoproteins of bio-medical interest.**“ eng. *Glycoconj J* 16.2, S. 99–107.

- Mayorga, M. E. und W. E. Timberlake (1990). „**Isolation and molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* wA gene.**“ eng. *Genetics* 126.1, S. 73–79.
- Metz, B. und N. W. F. Kossen (1977). „**The growth of molds in the form of pellets - a literature review**“. *Biotechnology and Bioengineering* 19.6, S. 781–799.
- Micheli, Pier Antonio (1729). ***Nova plantarum genetra juxta Tournafortii methodum disposita.*** Hrsg. von B. Paperinii. Florentiae.
- Mims, C.W., E.A. Richardson und W.E. Timberlake (1988). „**Ultrastructural analysis of conidiophore development in the fungus *Aspergillus nidulans* using freeze-substitution.**“ eng. *Protoplasma* 44.3, S. 132–141.
- Müller, Philip, Gerhard Weinzierl, Andreas Brachmann, Michael Feldbrügge und Regine Kahmann (2003). „**Mating and pathogenic development of the Smut fungus *Ustilago maydis* are regulated by one mitogen-activated protein kinase cascade.**“ *Eukaryot Cell* 2.6, S. 1187–1199.
- Morath, S.U., R. Hung und J.W. Bennett (2012). „**Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential**“. *Fungal Biology Review* 26, S. 73–83.
- Mukherjee, Prasun K., Jagannathan Latha, Ruthi Hadar und Benjamin A. Horwitz (2003). „**TmkA, a mitogen-activated protein kinase of *Trichoderma virens*, is involved in biocontrol properties and repression of conidiation in the dark.**“ eng. *Eukaryot Cell* 2.3, S. 446–455.
- Nevoigt, E. und U. Stahl (1997). „**Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.**“ eng. *FEMS Microbiol Rev* 21.3, S. 231–241.
- Nosanchuk, J. D. und A. Casadevall (1997). „**Cellular charge of *Cryptococcus neoformans*: contributions from the capsular polysaccharide, melanin, and monoclonal antibody binding.**“ eng. *Infect Immun* 65.5, S. 1836–1841.
- Oliver, P. T. (1972). „**Conidiophore and spore development in *Aspergillus nidulans*.**“ eng. *J Gen Microbiol* 73.1, S. 45–54.
- Pandey, Amita, M Gabriela Roca, Nick D. Read und N Louise Glass (2004). „**Role of a mitogen-activated protein kinase pathway during conidial germination and hyphal fusion in *Neurospora crassa*.**“ *Eukaryot Cell* 3.2, S. 348–358.

- Paoletti, Mathieu, Fabian A. Seymour, Marcos J C. Alcocer, Navgeet Kaur, Ana M. Calvo, David B. Archer und Paul S. Dyer (2007). „**Mating type and the genetic basis of self-fertility in the model fungus *Aspergillus nidulans*.**“ *Curr Biol* 17.16, S. 1384–1389.
- Papagianni, M., M. Mattey und B. Kristiansen (1998). „**Citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* as functions of the mixing intensity in a stirred tank and a tubular loop bioreactor**“ . *Biochemical Engineering Journal* 2.3, S. 197–205.
- Papagianni, Maria (2004). „**Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes.**“ *Biotechnol Adv* 22.3, S. 189–259.
- Park, Gyungsoon, Songqin Pan und Katherine A. Borkovich (2008). „**Mitogen-activated protein kinase cascade required for regulation of development and secondary metabolism in *Neurospora crassa*.**“ *Eukaryot Cell* 7.12, S. 2113–2122.
- Pasteur, Louis (1876). *Les Études sur la bière*. Gauthier-Villars.
- Pel, Herman J. *et al.* (2007). „**Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88.**“ *Nat Biotechnol* 25.2, S. 221–231.
- Perlman, D., D. A. Kita und W. H. Peterson (1946). „**Production of citric acid from cane molasses.**“ eng. *Arch Biochem* 11, S. 123–129.
- Perpetua, N. S., Y. Kubo, N. Yasuda, Y. Takano und I. Furusawa (1996). „**Cloning and characterization of a melanin biosynthetic THR1 reductase gene essential for appressorial penetration of *Colletotrichum lagenarium*.**“ eng. *Mol Plant Microbe Interact* 9.5, S. 323–329.
- Pihet, Marc, Patrick Vandeputte, Guy Tronchin, Gilles Renier, Patrick Saulnier, Sonia Georgeault, Romain Mallet, Dominique Chabasse, Françoise Symoens und Jean-Philippe Bouchara (2009). „**Melanin is an essential component for the integrity of the cell wall of *Aspergillus fumigatus* conidia.**“ *BMC Microbiol* 9, S. 177.
- Pontecorvo, G. (1956). „**The parasexual cycle in fungi.**“ eng. *Annu Rev Microbiol* 10, S. 393–400.

- Pontecorvo, G., J. A. Roper und E. Forbes (1953). „**Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus niger*.**“ eng. *J Gen Microbiol* 8.1, S. 198–210.
- Proft, M. und K. Struhl (2004). „**MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction.**“ eng. *Cell* 118.3, S. 351–361.
- Punt, P. J. und C. A. van den Hondel (1992). „**Transformation of filamentous fungi based on hygromycin B and phleomycin resistance markers.**“ eng. *Methods Enzymol* 216, S. 447–457.
- Punt, Peter J., Nick van Biezen, Ana Conesa, Alwin Albers, Jeroen Mangnus und Cees van den Hondel (2002). „**Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production.**“ eng. *Trends Biotechnol* 20.5, S. 200–206.
- Punt, P.J., A. Levasseur, H. Visser, J. Wery und E. Record (2011). „**Fungal Protein Production: Design and Production of Chimeric Proteins**“. *Annu. Rev. Microbiol.* 65, S. 57–69.
- Qi, Maosong und Elaine A. Elion (2005). „**MAP kinase pathways.**“ eng. *J Cell Sci* 118.Pt 16, S. 3569–3572.
- Ray, A. C. und R. E. Eakin (1975). „**Studies on the biosynthesis of aspergillin by *Aspergillus niger*.**“ eng. *Appl Microbiol* 30.6, S. 909–915.
- Reddy, N. R., M.D. Pierson, Shridhar K. Sathe, D.K. Salunkhe und Larry R. Beuchat (1983). „**Legume-based fermented foods: Their preparation and nutritional quality**“. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 17.4. PMID: 6759047, S. 335–370.
- Rehm, Hans-Jürgen (1980). „**Citronensäure**“. German. *Industrielle Mikrobiologie*. Springer Berlin Heidelberg, S. 253–263.
- Ringel, A. K. (2007). „**Agglomerationsverhalten von *Aspergillus niger* bei geschifteten pH-Werten.**“
- Riquelme, Meritxell, Oded Yarden, Salomon Bartnicki-Garcia, Barry Bowman, Ernestina Castro-Longoria, Stephen J. Free, Andre Fleissner, Michael Freitag, Roger R. Lew, Rosa Mouriño-Pérez, Michael Plamann, Carolyn Rasmussen, Corinna Richthammer, Robert W. Roberson, Eddy Sanchez-Leon, Stephan Seiler und Michael K. Watters (2011). „**Architecture and development of the *Neurospora crassa***“

- hypha – a model cell for polarized growth.“ eng. *Fungal Biol* 115.6, S. 446–474.
- Rosenberg, M., D. Gutnick und Rosenberg E. (1980). „**Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity**“. *FEMS Microbiology Letters* 9, S. 29–33.
- Roth, Andreas H F J. und Petra Dersch (2010). „**A novel expression system for intracellular production and purification of recombinant affinity-tagged proteins in *Aspergillus niger***.“ *Appl Microbiol Biotechnol* 86.2, S. 659–670.
- Ryoo, D. und C-S. Choi (1999). „**Surface thermodynamics of pellet formation in *Aspergillus niger***.“ *Biotechnology Letters* 21.2, S. 97–100.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis und H. A. Erlich (1988). „**Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase**.“ eng. *Science* 239.4839, S. 487–491.
- Saito, Haruo (2010). „**Regulation of cross-talk in yeast MAPK signaling pathways**.“ *Curr Opin Microbiol* 13.6, S. 677–683.
- Sambrook, J. und D. W. Russell (2001). ***Molecular Cloning. A Laboratory Manual***. Coldspring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis (1989). ***Molecular Cloning - A Laboratory Manual***. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Samson, R. A., P. Noonim, M. Meijer, J. Houbraken, J. C. Frisvad und J. Varga (2007). „**Diagnostic tools to identify black aspergilli**.“ eng. *Stud Mycol* 59, S. 129–145.
- Schmidt, F. R. (2004). „**Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry**.“ eng. *Appl Microbiol Biotechnol* 65.4, S. 363–372.
- Schmit, J. C. und S. Brody (1976). „**Biochemical genetics of *Neurospora crassa* conidial germination**.“ eng. *Bacteriol Rev* 40.1, S. 1–41.
- Semova, Natalia, Reginald Storms, Tricia John, Pascale Gaudet, Peter Ulyczynj, Xiang Min, Jian Sun, Greg Butler und Adrian Tsang (2006). „**Generation, annotation, and analysis of an extensive *Aspergillus niger* EST collection**“. *BMC Microbiology* 6.1, S. 7.

- Seviour, R.J. und M.A. Read (1985). „**Electrophoretic mobility of conidia of *Aspergillus niger*, and the role of their surface properties in pelleting**“. *Trans Br Mycol Soc* 84, S. 745–747.
- Sewall, T. C., C. W. Mims und W. E. Timberlake (1990a). „**abaA controls phialide differentiation in *Aspergillus nidulans***.“ eng. *Plant Cell* 2.8, S. 731–739.
- (1990b). „**Conidium differentiation in *Aspergillus nidulans* wild-type and wet-white (wetA) mutant strains**.“ eng. *Dev Biol* 138.2, S. 499–508.
- Simonin, Anna, Javier Palma-Guerrero, Mark Fricker und N Louise Glass (2012). „**Physiological significance of network organization in fungi**.“ eng. *Eukaryot Cell* 11.11, S. 1345–1352.
- Skromne, I., O. Sánchez und J. Aguirre (1995). „**Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans* brlA regulatory gene**.“ eng. *Microbiology* 141 (Pt 1), S. 21–28.
- Sánchez-Mir, L., A. Franco, M. Madrid, J. Vicente-Soler, M. A. Villar-Tajadura, T. Soto, P. Pérez, M. Gacto und J. Cansado (2012). „**Biological significance of nuclear localization of mitogen-activated protein kinase Pmk1 in fission yeast**.“ eng. *J Biol Chem* 287.31, S. 26038–26051.
- Southern, E. M. (1975). „**Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis**.“ eng. *J Mol Biol* 98.3, S. 503–517.
- Stine, G. J. und A. M. Clark (1967). „**Synchronous production of conidiophores and conidia of *Neurospora crassa***.“ *Can J Microbiol* 13.5, S. 447–453.
- Sumathi und Manju (2000). „**Uptake of reactive textile dyes by *Aspergillus foetidus***.“ eng. *Enzyme Microb Technol* 27.6, S. 347–355.
- Taheri-Talesh, N., T. Horio, L. Araujo-Bazan, X. Dou, E. A. Espeso, M. A. Penalva, S. A. Osmani und B. R. Oakley (2008). „**The Tip Growth Apparatus of *Aspergillus nidulans***“. *Molecular Biology of the Cell* 19, 1439–1449.
- Takano, Y., T. Kikuchi, Y. Kubo, J. E. Hamer, K. Mise und I. Furusawa (2000). „**The *Colletotrichum lagenarium* MAP kinase gene CMK1 regulates diverse aspects of fungal pathogenesis**.“ eng. *Mol Plant Microbe Interact* 13.4, S. 374–383.
- Timberlake, W. E. (1990a). „**Molecular genetics of *Aspergillus* development**.“ eng. *Annu Rev Genet* 24, S. 5–36.

- Timberlake, W. E. (1990b). „**Molecular genetics of *Aspergillus* development.**“ eng. *Annu Rev Genet* 24, S. 5–36.
- Tronchin, G., J. P. Bouchara, G. Larcher, J. C. Lissitzky und D. Chabasse (1993). „**Interaction between *Aspergillus fumigatus* and basement membrane laminin: binding and substrate degradation.**“ eng. *Biol Cell* 77.2, S. 201–208.
- Tronchin, G., J. P. Bouchara, M. Ferron, G. Larcher und D. Chabasse (1995). „**Cell surface properties of *Aspergillus fumigatus* conidia: correlation between adherence, agglutination, and rearrangements of the cell wall.**“ eng. *Can J Microbiol* 41.8, S. 714–721.
- Tronchin, G., K. Esnault, G. Renier, R. Filmon, D. Chabasse und J. P. Bouchara (1997). „**Expression and identification of a laminin-binding protein in *Aspergillus fumigatus* conidia.**“ eng. *Infect Immun* 65.1, S. 9–15.
- Tsai, H. F., Y. C. Chang, R. G. Washburn, M. H. Wheeler und K. J. Kwon-Chung (1998). „**The developmentally regulated *alb1* gene of *Aspergillus fumigatus*: its role in modulation of conidial morphology and virulence.**“ *J Bacteriol* 180.12, S. 3031–3038.
- Tsai, H. F., M. H. Wheeler, Y. C. Chang und K. J. Kwon-Chung (1999). „**A developmentally regulated gene cluster involved in conidial pigment biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*.**“ *J Bacteriol* 181.20, S. 6469–6477.
- Tsai, H. F., I. Fujii, A. Watanabe, M. H. Wheeler, Y. C. Chang, Y. Yasuoka, Y. Ebizuka und K. J. Kwon-Chung (2001). „**Pentaketide melanin biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* requires chain-length shortening of a heptaketide precursor.**“ eng. *J Biol Chem* 276.31, S. 29292–29298.
- Tsukahara, T. (1968). „**Electron microscopy of swelling and germinating conidiospores of *Aspergillus niger*.**“ eng. *Sabouraudia* 6.3, S. 185–191.
- Upshall, A. (1981). „**Naturally occurring diploid isolates of *Aspergillus nidulans*.**“ eng. *J Gen Microbiol* 122.1, S. 7–10.
- van Diepeningen, A. D., A. J. Debets und R. F. Hoekstra (1997). „**Heterokaryon incompatibility blocks virus transfer among natural isolates of black *Aspergilli*.**“ eng. *Curr Genet* 32.3, S. 209–217.

- Villena, G. K. und M. Gutiérrez-Correa (2006). „**Production of cellulase by *Aspergillus niger* biofilms developed on polyester cloth.**“ *Lett Appl Microbiol* 43.3, S. 262–268.
- (2007). „**Morphological patterns of *Aspergillus niger* biofilms and pellets related to lignocellulolytic enzyme productivities.**“ *Lett Appl Microbiol* 45.3, S. 231–237.
- Villena, G. K., T. Fujikawa, S. Tsuyumu und M. Gutiérrez-Correa (2010). „**Structural analysis of biofilms and pellets of *Aspergillus niger* by confocal laser scanning microscopy and cryo scanning electron microscopy.**“ *Bioresour Technol* 101.6, S. 1920–1926.
- Virag, Aleksandra und Steven D. Harris (2006). „**The Spitzenkörper: a molecular perspective.**“ eng. *Mycol Res* 110.Pt 1, S. 4–13.
- Wagner, M., P. Briza, M. Pierce und E. Winter (1999). „**Distinct steps in yeast spore morphogenesis require distinct SMK1 MAP kinase thresholds.**“ eng. *Genetics* 151.4, S. 1327–1340.
- Ward, Owen P. (2012). „**Production of recombinant proteins by filamentous fungi.**“ eng. *Biotechnology Advances* 30.5, S. 1119–1139.
- Wargenau, Andreas, Andre Fleissner, Christoph Josef Bolten, Manfred Rohde, Ingo Kampen und Arno Kwade (2011). „**On the origin of the electrostatic surface potential of *Aspergillus niger* spores in acidic environments.**“ *Res Microbiol* 162.10, S. 1011–1017.
- Watanabe, Y., G. Takaesu, M. Hagiwara, K. Irie und K. Matsumoto (1997). „**Characterization of a serum response factor-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*, Rlm1, which has transcriptional activity regulated by the Mpk1 (Slt2) mitogen-activated protein kinase pathway.**“ eng. *Mol Cell Biol* 17.5, S. 2615–2623.
- Wei, Huijun, Natalia Requena und Reinhard Fischer (2003). „**The MAPKK kinase SteC regulates conidiophore morphology and is essential for heterokaryon formation and sexual development in the homothallic fungus *Aspergillus nidulans*.**“ *Mol Microbiol* 47.6, S. 1577–1588.
- Wiebe, M. G., A. Karandikar, G. D. Robson, A. P. Trinci, J. L. Candia, S. Trappe, G. Wallis, U. Rinas, P. M. Derkx, S. M. Madrid, H. Sisniega, I. Faus, R. Montijn, C.

- A. van den Hondel und P. J. Punt (2001). „**Production of tissue plasminogen activator (t-PA) in *Aspergillus niger*.**“ eng. *Biotechnol Bioeng* 76.2, S. 164–174.
- Wilhelm IV von Bayern, Herzog (1516). *Das Deutsche Reinheitsgebot*.
- Wilson, J. F. und J. A. Dempsey (1999). „**A hyphal fusion mutant in *Neurospora crassa*.**“ *Fungal Genet Newsl* 46.
- Withers, J. M., R. J. Swift, M. G. Wiebe, G. D. Robson, P. J. Punt, C. A. van den Hondel und A. P. Trinci (1998). „**Optimization and stability of glucoamylase production by recombinant strains of *Aspergillus niger* in chemostat culture.**“ eng. *Biotechnol Bioeng* 59.4, S. 407–418.
- Wittier, R., H. Baumgartl, D. W. Lübbers und K. Schügerl (1986). „**Investigations of oxygen transfer into *Penicillium chrysogenum* pellets by microprobe measurements.**“ eng. *Biotechnol Bioeng* 28.7, S. 1024–1036.
- Wösten, H. A. (2001). „**Hydrophobins: multipurpose proteins.**“ eng. *Annu Rev Microbiol* 55, S. 625–646.
- Xu, J. R. und J. E. Hamer (1996). „**MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*.**“ *Genes Dev* 10.21, S. 2696–2706.
- Yager, L. N., M. B. Kurtz und S. P. Champe (1982). „**Temperature-shift analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*.**“ eng. *Dev Biol* 93.1, S. 92–103.
- Zamyatnin, A.A. (1984). „**Amino Acid, Peptide, and Protein Volume in Solution.**“ *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 13, S. 145–165.
- Zuccaro, A., S. Götze, S. Kneip, P. Dersch und J. Seibel (2008). „**Tailor-made fructooligosaccharides by a combination of substrate and genetic engineering.**“ *Chembiochem* 9, S. 143–149.

5 Anhang

5.1 Messwerte

Messwerte der Sporenverteilung zwischen wässriger- und Hexadekan-Phase

Tab. 5.1: OD₄₀₀ in der wässrigen Phase
vor der Übersichtung mit Hexadekan

AB1.13	$\Delta alb1$ AB	SKAn1015	$\Delta alb1$ SK
1,29	0,61	0,542	0,47

nach der Übersichtung mit Hexadekan

0,756	0,305	0,282	0,273
0,682	0,231	0,289	0,288
0,664	0,321	0,316	0,282

Häufigkeit der gemessenen Partikelgrößen bei der Messung des Aggregationsverhalten

Tab. 5.2: Häufigkeitsverteilung für SKAn1015 und *alb1*SK

	pH 2,0		pH 3,5	
	SKAn1015	$\Delta alb1$ SK	SKAn1015	$\Delta alb1$ SK
20	7	43	41	6
40	12	27	31	15
60	14	8	13	6
80	5	6	5	4
100	8	3	1	4
250	30	14	9	17
500	5	0	0	7
1000	20	0	0	40

Tab. 5.3: Häufigkeitsverteilung für AB1.13 und *alb1* AB

pH 2,0			pH 3,5	
	AB1.13	$\Delta alb1$ AB	AB1.13	$\Delta alb1$ AB
20	20	60	50	22
40	17	22	35	35
60	11	5	7	8
80	7	3	0	2
100	14	1	0	2
250	31	6	8	5
500	0	3	0	6
1000	0	0	0	18

Sukrase- und Glucoamylaseaktivität von Pellets und im Überstand

Tab. 5.4: Glucoamylaseaktivität von AB1.13 und *alb1* AB in $\mu\text{kat/ml}$

	AB1.13	$\Delta alb1$ AB
Pelletassoziiert	$25,6 \pm 7,8$	$22,5 \pm 6,9$
im Überstand	$19,2 \pm 4,8$	$13,0 \pm 5,4$

Tab. 5.5: Sukraseaktivität von SKAn1015 und *alb1* SK in U/ml

	SKAn1015	$\Delta alb1$ SK
Pelletassoziiert	$20,6 \pm 3,1$	$26,5 \pm 6,6$
im Überstand	$23,2 \pm 2,3$	$26,1 \pm 3,8$

Flächenbedeckung der Trägerschicht nach 22,5 h Schütteln der Proben

Tab. 5.6: Oberflächenbedeckung mit Sporen und Keimlingen in Prozent

AB1.13	$\Delta alb1$ AB	SKAn1015	$\Delta alb1$ SK
$0,054 \pm 0,042$	$7,305 \pm 1,371$	$0,190 \pm 0,029$	$6,967 \pm 0,485$

Pellet- und Biofilmmaktivität und -trockenmasse

Tab. 5.7: Glucoamylaseaktivität in $\mu\text{kat}/\text{ml}$ und Trockenmasse in mg

	Biofilm	Pellet
Aktivität	$75,65 \pm 22,5$	$4,3 \pm 3,4$
Trockenmasse	$0,13 \pm 0,01$	$0,18 \pm 0,02$

Sporenzahl radiär wachsender Kolonien und deren Durchmesser

Tab. 5.8: Sporenzahl pro cm^2 Koloniefäche

	48h	72h	96h
AB1.13	$3,2 \times 10^7 \pm 7,1 \times 10^6$	$3,0 \times 10^7 \pm 3,1 \times 10^6$	$3,0 \times 10^7 \pm 8,1 \times 10^6$
$\Delta makbAB$	$6,5 \times 10^5 \pm 2,8 \times 10^5$	$3,8 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^5$	$9,9 \times 10^6 \pm 1,9 \times 10^6$
$\Delta makbAB_{makb}$	$2,3 \times 10^7 \pm 7,0 \times 10^6$	$2,5 \times 10^7 \pm 5,9 \times 10^6$	$2,1 \times 10^7 \pm 4,5 \times 10^6$
$\Delta ste7AB$	$7,5 \times 10^5 \pm 9,3 \times 10^4$	$3,1 \times 10^6 \pm 5,9 \times 10^5$	$8,7 \times 10^6 \pm 1,2 \times 10^6$
$\Delta ste7AB_{ste7}$	$2,2 \times 10^7 \pm 4,6 \times 10^6$	$2,4 \times 10^7 \pm 5,7 \times 10^6$	$2,4 \times 10^7 \pm 1,5 \times 10^6$
$makb-gfpAB$	$2,6 \times 10^7 \pm 1,0 \times 10^6$	$2,6 \times 10^7 \pm 7,0 \times 10^6$	$2,2 \times 10^7 \pm 9,6 \times 10^5$

Tab. 5.9: Koloniefäche in cm²

	48h	72h	96h
AB1.13	2,3	4,9	9,5
$\Delta makbAB$ und $\Delta ste7AB$	1,9	4,3	7,7
$\Delta makbAB_makb$, $\Delta ste7AB_ste7$ und $makb-gfpAB$	2,2	4,7	9,2

Keimungsrate auf Minimal-Medium**Tab. 5.10:** Keimungsrate in Prozent

	6h	8h
AB1.13	83 \pm 3	-
$\Delta makbAB$	16 \pm 9	85 \pm 3
$\Delta makbAB_makb$	88 \pm 1	-
$\Delta ste7AB$	10 \pm 4	84 \pm 5
$\Delta ste7AB_ste7$	61 \pm 5	-
$makb-gfpAB$	78 \pm 6	-

Radiäres Koloniewachstum auf Minimal-Medium

Tab. 5.11: Myzelfrontwachstum in mm

	in 24 h
AB1.13	$4,4 \pm 0,2$
$\Delta makbAB$	$3,9 \pm 0,1$
$\Delta makbAB_makb$	$4,3 \pm 0,2$
$\Delta ste7AB$	$3,9 \pm 0,1$
$\Delta ste7AB_ste7$	$4,4 \pm 0,2$
$makb-gfpAB$	$4,3 \pm 0,2$

Radiäres Koloniewachstum auf Minimal-Medium mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen

Tab. 5.12: Myzelfrontwachstum in mm

Glukose [M]	AB1.13	$\Delta makbAB$	$\Delta ste7AB$
0,0125	$4,9 \pm 0,1$	$4,5 \pm 0,1$	$4,5 \pm 0,2$
0,025	$5,1 \pm 0,3$	$4,5 \pm 0,4$	$4,5 \pm 0,5$
0,05	$4,9 \pm 0,3$	$4,0 \pm 0,0$	$4,0 \pm 0,0$
0,1	$4,8 \pm 0,3$	$3,9 \pm 0,5$	$3,8 \pm 0,5$
0,2	$4,5 \pm 0,3$	$3,9 \pm 0,5$	$3,8 \pm 0,5$
0,4	$5,0 \pm 0,0$	$4,8 \pm 0,5$	$4,1 \pm 0,5$
0,8	$7,0 \pm 0,3$	$5,9 \pm 0,3$	$5,8 \pm 0,0$
1,6	$6,1 \pm 0,3$	$4,7 \pm 0,0$	$4,7 \pm 0,4$
3,2	$1,2 \pm 0,0$	$0,8 \pm 0,3$	$0,8 \pm 0,3$

Sporenbildung von synchronisiertem Myzel auf Minimal-Medium mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen

Tab. 5.13: Sporen pro cm² nach 24 h

Glukose [M]	AB1.13	$\Delta makbAB$	$\Delta ste7AB$
0,0125	$3,7 \times 10^6 \pm 3,2 \times 10^5$	$3,5 \times 10^6 \pm 5,5 \times 10^5$	$2,7 \times 10^6 \pm 1,4 \times 10^6$
0,1	$3,0 \times 10^6 \pm 1,7 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6 \pm 1,6 \times 10^6$	$4,8 \times 10^6 \pm 2,9 \times 10^5$
0,4	$1,9 \times 10^6 \pm 4,9 \times 10^5$	$2,6 \times 10^6 \pm 1,9 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6 \pm 1,4 \times 10^6$
1,6	$5,1 \times 10^5 \pm 3,7 \times 10^5$	$7,0 \times 10^5 \pm 3,1 \times 10^5$	$2,9 \times 10^5 \pm 3,4 \times 10^4$
3,2	$1,5 \times 10^5 \pm 7,7 \times 10^4$	$2,9 \times 10^5 \pm 7,8 \times 10^4$	$1,4 \times 10^6 \pm 1,2 \times 10^4$

Tab. 5.14: Sporen pro cm² nach 48 h

Glukose [M]	AB1.13	$\Delta\textit{makbAB}$	$\Delta\textit{ste7AB}$
0,0125	$1,7 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6 \pm 8,8 \times 10^5$	$1,6 \times 10^6 \pm 8,7 \times 10^5$
0,1	$4,4 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6 \pm 2,7 \times 10^5$	$2,9 \times 10^6 \pm 1,4 \times 10^5$
0,4	$8,6 \times 10^6 \pm 5,9 \times 10^5$	$2,2 \times 10^6 \pm 8,5 \times 10^5$	$4,8 \times 10^6 \pm 1,4 \times 10^6$
1,6	$1,2 \times 10^7 \pm 8,7 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6 \pm 8,1 \times 10^5$	$3,5 \times 10^6 \pm 5,4 \times 10^5$
3,2	$1,5 \times 10^7 \pm 2,7 \times 10^6$	$5,7 \times 10^5 \pm 8,0 \times 10^4$	$5,3 \times 10^5 \pm 2,3 \times 10^5$

Tab. 5.15: Sporen pro cm² nach 72 h

Glukose [M]	AB1.13	$\Delta\textit{makbAB}$	$\Delta\textit{ste7AB}$
0,0125	$2,5 \times 10^6 \pm 1,6 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6 \pm 1,4 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6 \pm 4,7 \times 10^5$
0,1	$4,7 \times 10^6 \pm 3,3 \times 10^6$	$3,4 \times 10^6 \pm 1,9 \times 10^5$	$1,9 \times 10^6 \pm 2,8 \times 10^5$
0,4	$5,8 \times 10^6 \pm 9,2 \times 10^5$	$2,9 \times 10^6 \pm 5,5 \times 10^5$	$5,2 \times 10^6 \pm 7,2 \times 10^5$
1,6	$1,5 \times 10^7 \pm 2,3 \times 10^6$	$3,4 \times 10^6 \pm 2,7 \times 10^5$	$4,1 \times 10^6 \pm 1,8 \times 10^6$
3,2	$1,8 \times 10^7 \pm 7,6 \times 10^5$	$7,1 \times 10^5 \pm 1,0 \times 10^5$	$8,4 \times 10^5 \pm 1,6 \times 10^5$

5.2 Plasmidkarten

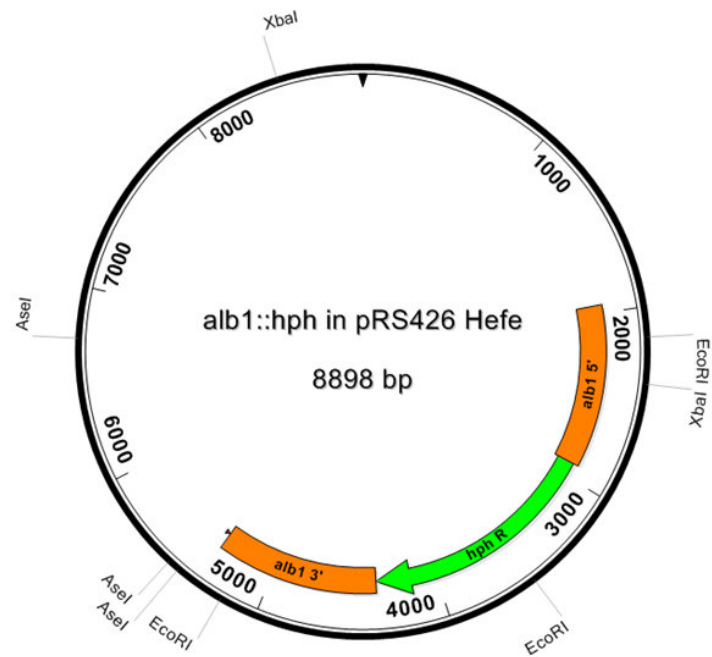


Abb. 5.1: *alb1*-Ausschaltkassette in pRS426

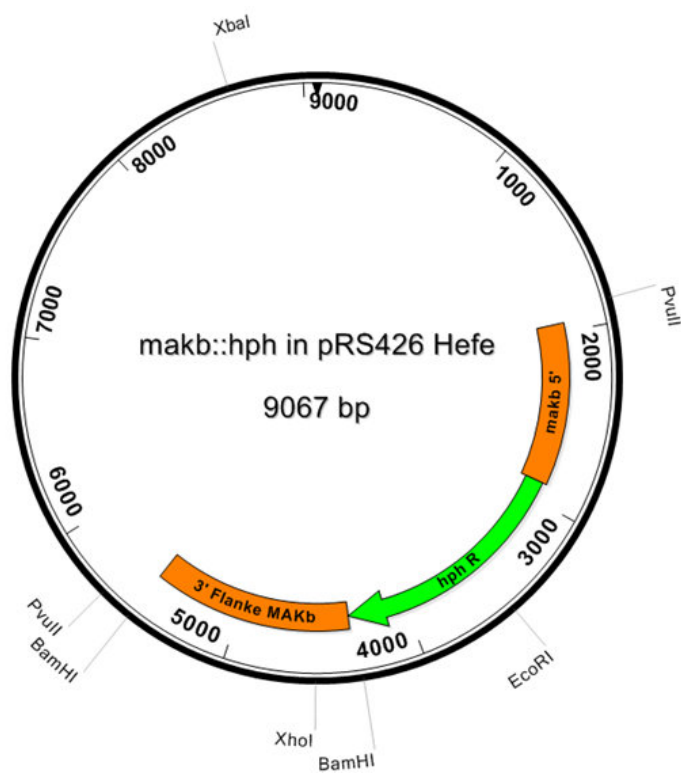


Abb. 5.2: *makb*-Ausschaltkassette in pRS426

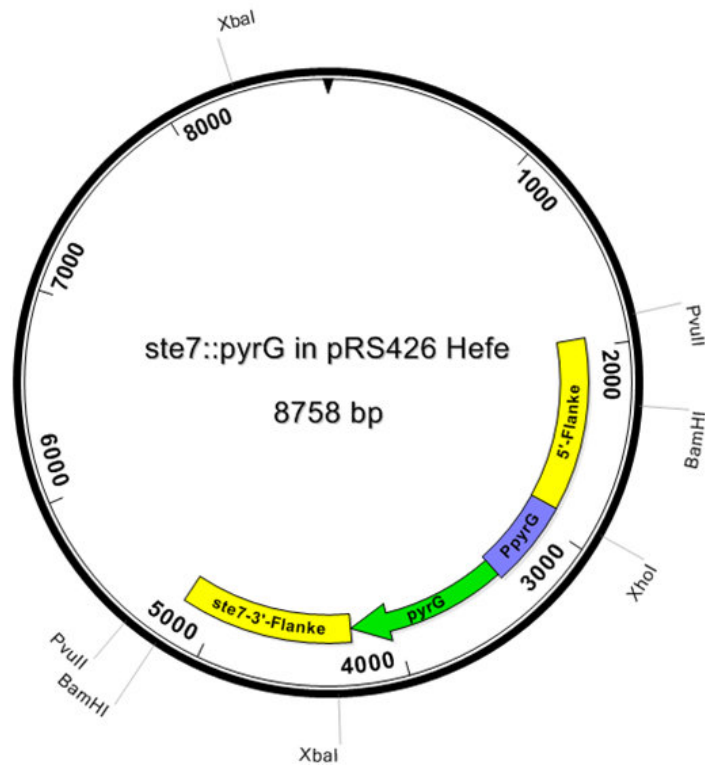


Abb. 5.3: *ste7*-Ausschaltkassette in pRS426

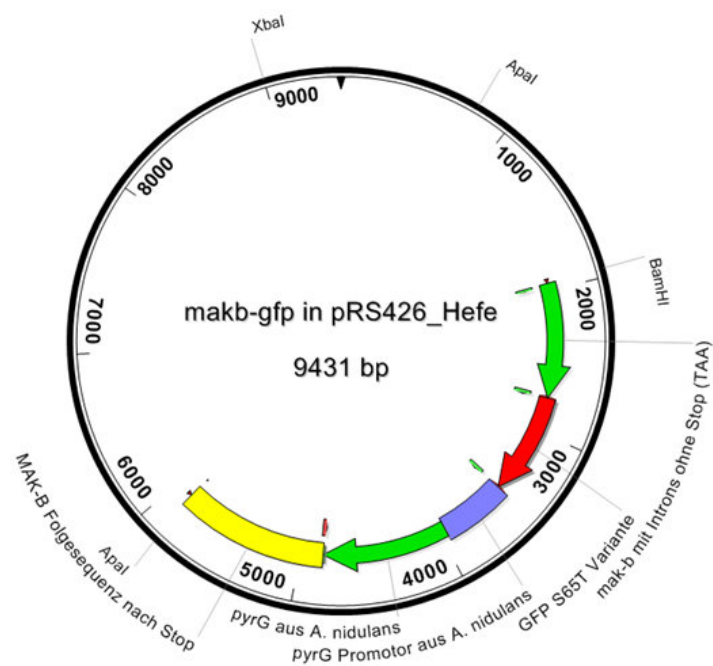


Abb. 5.4: *makb-gfp*-Integrationskassette in pRS426

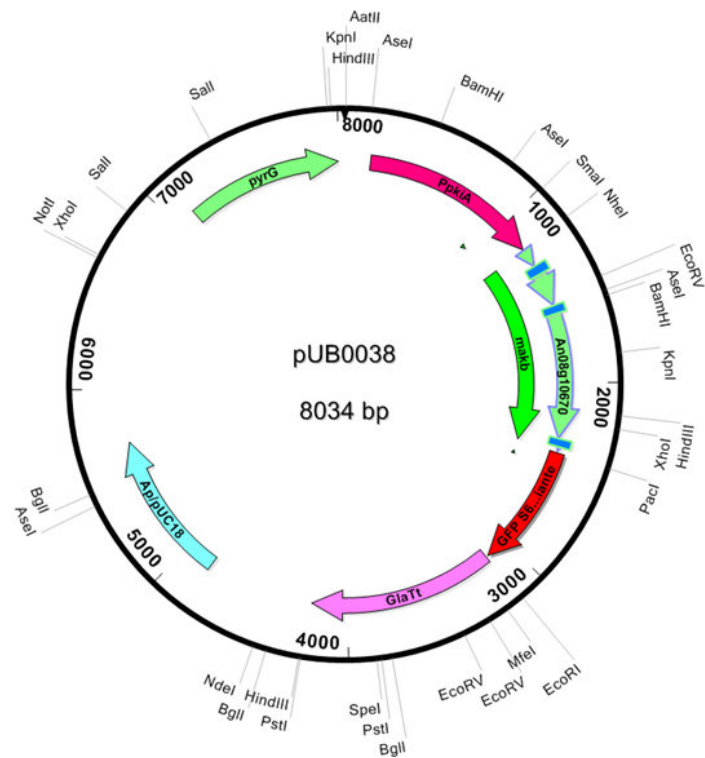


Abb. 5.5: Plasmid pUB0038 für die starke ektopische Expression von *makB-gfp*

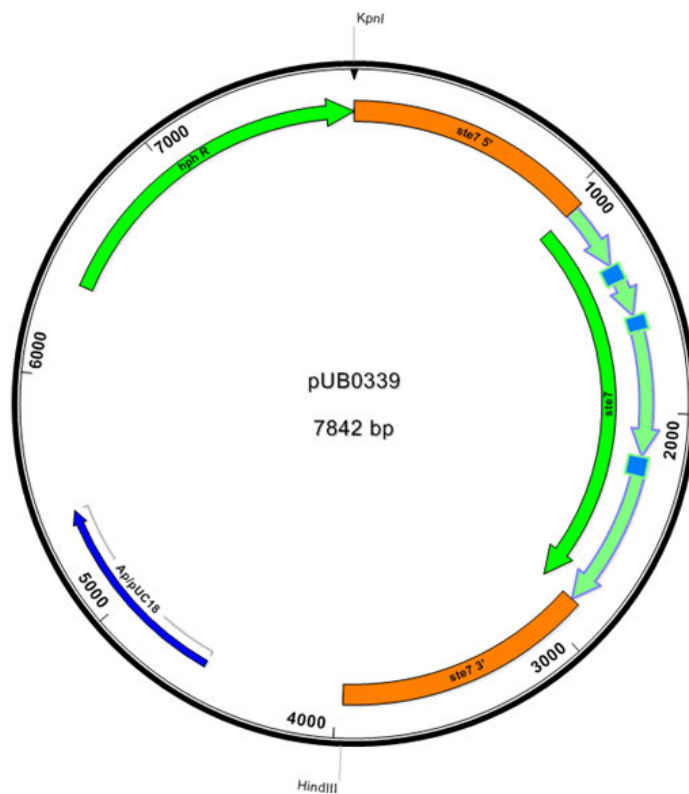


Abb. 5.6: Plasmid pUB0339 für die Komplementierung von $\Delta ste7AB$

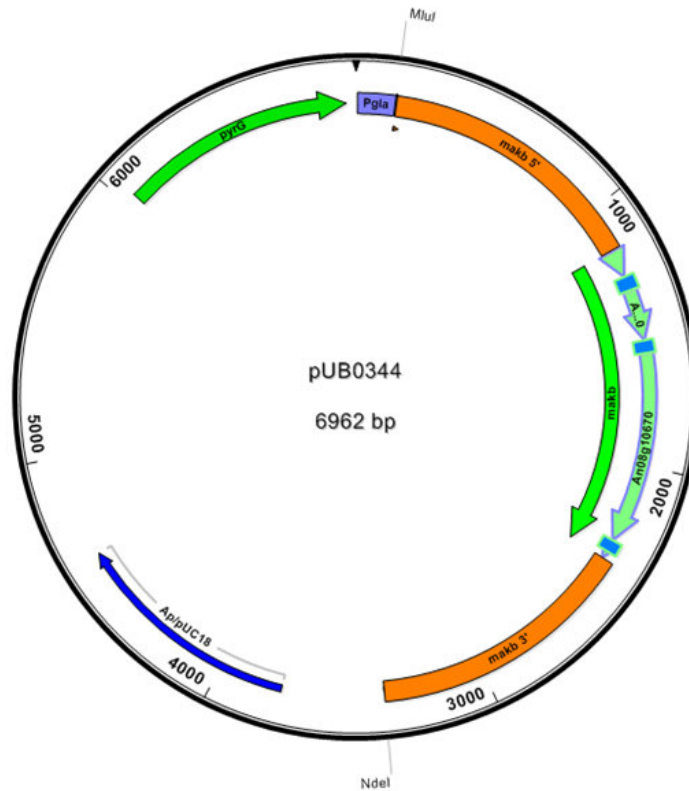


Abb. 5.7: Plasmid pUB0344 für die Komplementierung von $\Delta makBAB$

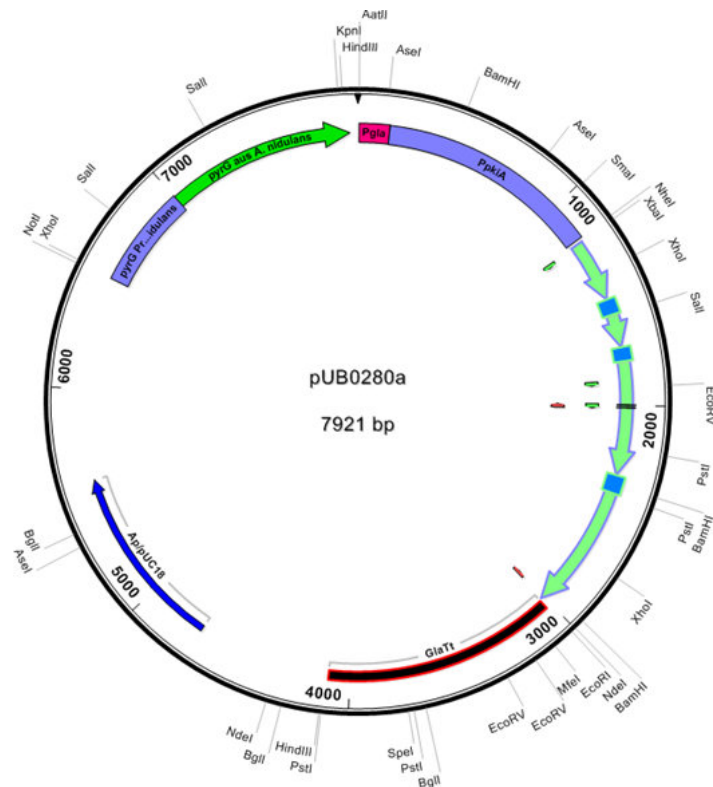


Abb. 5.8: Plasmid pUB0280a für die Überexpression des dominant aktiven *ste7* Allels

Abkürzungen

Allgemeine Abkürzungen

Abb.	Abbildung	ml	Milliliter
bzw.	beziehungsweise	mm	Millimeter
ca.	circa	o. Abb.	ohne Abbildung
cm	Zentimeter	SDS	Natriumdodecylsulfat
d.h.	das heißt	Sek	Sekunde
ggf.	gegebenenfalls	Sl	Stammlösung
h	Stunden	Tab.	Tabelle
Hyg	Hygromycin	u.a.	unter anderem
H ₂ O	Dihydrogenmonoxid	UpM	Umdrehungen pro Minute
Kap.	Kapitel	V	Volt
Min	Minute	z.B.	zum Beispiel
mg	Milligramm	z.T.	zum Teil

Biologische Abkürzungen

alb / ALB	Albino	bp	Basenpaare
cek	<i>Candida albicans</i>	ERK-like kinase	
erk / ERK	extracellular regulated kinase		
fus / Fus	fusion	GAM	Glucoamylase
hog / Hog	high osmolarity and glycerol		
kb	Kilobasenpaare	kdx	kinase dead x
kss / Kss	kinase suppressor of Sst2		
MAK	mitogen activated protein kinase		
MAKK	MAK kinase	MAKKK	MAKK kinase
mpk	mitogen activated protein kinase		
PCR	Polymerasekettenreaktion		
pks	Polyketidsynthase	pmk	pathogenicity MAP kinase
spm	specifically activated protein kinase		
slt2	suppressor of lyt2	ste / Ste	sterile
YRC	rekombinante Hefeklonierung		

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. André Fleißner für die Gelegenheit, meine Doktorarbeit an diesem interessanten Thema in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Im Laufe der Arbeit im Labor und auch beim Interpretieren der Daten unterstützte er mich immer mit größtem Enthusiasmus, was mir viele neue Blickwinkel und Ideen im Bezug zu meinen Fragestellungen eröffnete.

Großen Dank gilt auch Prof. Dr. Norbert Käufer für die freundliche Übernahme des Koreferats, des Prüfungsvorsitzes und den vielen kritischen Diskussionen, die wir im Laufe der Jahre in den gemeinsamen Seminaren hatten.

Prof. Dr. Ursula Bilitewski möchte ich herzlich für ihre Bereitschaft, als Prüfer an meiner Promotionskommission teilzunehmen, danken.

Prof. Dr. Ralf Schnabel und Christian Hennig danke ich für die Unterstützung bei allen Fragen zur Mikroskopie und Computertechnik.

Besonderer Dank gilt auch Ulrike Brandt, die mir bei vielen methodischen Problemen stets zu Hilfe kam und mich bei meiner Arbeit praktisch unterstützte.

Ebenso möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Genetik für ihre Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Insbesondere bei Martin Weichert und Marlies Becker für das Korrekturlesen meiner Arbeit und für hilfreiche Anregungen, sowie bei den aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern und Studenten unserer Arbeitsgruppe Christian Adis, Daniela Heine, Diana Patzelt, Linda Petereit, Timo Schürg, David Havlik, Julia Illgen, Marion Utecht und Ute Kyrath.

Abschließend bedanke ich mich bei meiner Familie für die vielseitige Unterstützung, die ich im Laufe der letzten Jahre durch sie erfahren habe und ohne deren Hilfe ich diese Arbeit in dieser Form nicht hätte verfassen können.

Bei meiner Freundin Carolin bedanke ich mich für das Korrekturlesen meiner Arbeit, für die Freizeit, die wir zusammen verbrachten und für die Geduld, die sie mit mir hatte, wenn die Arbeit mal nicht perfekt lief.